

**Synthese von Acetoin und 2,3-Butandiol durch Mikroben-
Elektroden-Interaktion mit *S. oneidensis***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines/einer

DOKTORS/DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Thea Viola Bursac
(geb. Vogel)

1. Referent/Referentin: Professor Doktor Johannes Gescher

2. Referent/Referentin: Professor Doktor Anne-Kristin Kaster

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -
4.0 International Lizenz. (Attribution - NonCommercial - NoDerivs)

I. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Teile, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Werken entnommen sind, sind von mir durch Angabe der Quelle gekennzeichnet. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KIT beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Karlsruhe, den 25. April 2019

Thea Bursac

II. Danksagung

Zunächst möchte ich Johannes Gescher danken, für die tolle und inspirierende Zusammenarbeit und Unterstützung über die Arbeit hinaus. Dein Enthusiasmus und deine Freude an der Wissenschaft haben mich immer angesteckt.

Allen Kooperationspartnern danke ich für die gute Zusammenarbeit, der Bereitstellung von Materialien und für die wertvollen Diskussionen.

Der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Zeit am Institut. Ihr seid ein wunderbares Team immer für eine fachliche Diskussion, einen Spass oder eine Problemlösung zu haben. Auch denjenigen die bereits die Arbeitsgruppe verlassen haben, danke ich für die schöne Zeit und bin froh, dass wir uns immer noch sehen. Es hat immer Spass gemacht zur Arbeit zu gehen!

Im Besonderen möchte ich Miri für ihre Unterstützung, offenes Ohr und die unzähligen Probennahmen danken.

Sebastian, du bist ein wunderbarer Weggefährte durch diese aufregende Zeit der Promotion gewesen. Ich bin so froh, dass wir zusammen auf einem Projekt waren und dadurch so eng zusammenarbeiten konnten. Du hast mich immer mit deinem Forschungseifer inspiriert. Danke auch für deine Hilfe, Geduld und Ratschläge.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während dieser Zeit und des gesamten Studiums. Danke, dass ihr euch immer Zeit genommen habt!

Einen großen Dank auch an meine treuen Wegbegleiter Julia und Katrin aus dem Studium. Schön, dass wir auch dieses Abenteuer zusammen gemeistert haben.

Niko, du bist der Grund warum ich diese Zeilen schreiben kann, ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen. Danke für deine Geduld, dein Coaching und ja auch für deine Burndown-Charts, für deine Unterstützung und Cheerleader-Dasein während der Endzüge. Danke für unser schönes Familienleben!

Meinen lieben Töchtern Lia und Mara danke ich, für eure Fähigkeit mich immer zum Lachen zu bringen und mich an jeden Tag glücklich zu machen.

III. Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Bursac, T., Gralnick, J.A., und Gescher, J. (2017) Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol Bioeng* **114**: 1283-1289

Beblawy, S., Bursac, T., und Gescher, J. (2018) Elektrofermentation von Acetoin. *Biospektrum* **24**: 100–103 (2018)

Beblawy, S., Bursac, T., Paquete, C., Louro, R., Clarke, T.A., und Gescher, J. (2018) Extracellular reduction of solid electron acceptors by *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol* **109**: 571–583

Konferenzbeitrag

Vortrag auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Jena (März 2016) - Acetoin production via unbalanced fermentation in *S. oneidensis*

Poster-Präsentation auf der Konferenz „New Frontiers for Biotech Processes“ (DECHEMA) in Koblenz (Mai 2016) - Synthesis of 2,3-butanediol via microbe-electrode-interaction in *Shewanella oneidensis* MR-1

Poster-Präsentation auf dem 4. Workshop der Plattforminitiative Mikrobielle Bioelektrotechnologie in Braunschweig (November 2016) - Acetoin and 2,3-butanediol production via unbalanced fermentation in *S. oneidensis*

IV. Zusammenfassung

Shewanella oneidensis dient als Modellorganismus in bioelektrochemischen Systemen. Während *S. oneidensis* eine große Spannbreite an Elektronenakzeptoren nutzen kann, ist die Auswahl an nutzbaren Kohlenstoffquellen eher gering. Daher wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die Erweiterung des Substrat- als auch Produktspektrums gelegt. Hierbei ist sowohl der nachwachsende Rohstoff Cellulose von Interesse, als auch der in großen Mengen bei der Biodieselherstellung auftretende Rohstoff Glycerin.

S. oneidensis wurde in Vorarbeiten befähigt über eine an ein lösliches c-Typ Cytochrom gekoppelte Cellulase Cellulose in Cellobiose-Untereinheiten zu spalten. In einer Cokultivierung mit dem Cellobiose-verstoffwechelnden, homofermentativen Laktatbildner *Lactococcus lactis* konnte anhand der Acetatbildung die Funktionalität bereits gezeigt werden. Um die Handhabung zu erleichtern, wurde die Cellobiase aus *L. lactis* in *S. oneidensis* integriert um dieses ohne Cokultivierung zu einer Cellulose-Verstoffwechselung zu befähigen. Diese Integration führte zu keiner Degradation von Cellobiose unter aeroben Bedingungen.

Weiterhin wurde ein Glycerinabbauweg konzipiert um *S. oneidensis* zum Glycerinabbau zu befähigen. Hierbei wurden die Gene für die Methylglyoxalsynthase, Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, Glyoxalase III und der Glycerin-Transporter aus *E. coli* auf ein Expressions-Plasmid eingefügt. Zusätzlich wurde die *S. oneidensis*-eigene Glycerinkinase auf dem Plasmid integriert um diese höher zu exprimieren. Dieses Plasmid ermöglichte bisher *S. oneidensis* keinen Abbau von Glycerin.

Acetoin und Butandiol sind vielversprechende Plattformchemikalien und *S. oneidensis* ist nativ nicht in der Lage diese zu produzieren. In dieser Arbeit wurden Stämme genutzt, die die entsprechenden Gene zum einen über ein Plasmid und zum anderen genomisch integriert tragen. Hierbei zeigte sich in Zellsuspensionsassays eine Erweiterung des Produktspektrums zu Acetat und Acetoin bzw. Acetat, Acetoin und Butandiol. In der Regel war Acetat zu gleichem oder in höherem Anteil detektierbar. Die maximalen Acetoinausbeuten betragen in diesem Fall zwar 107% des theoretischen Maximums, jedoch ist die Kohlenstoffbilanz nicht ausgeglichen. In den Stämmen die kein Acetat mehr bilden konnten wurde ebenfalls eine Acetoinproduktion

von 101% des theoretischen Maximums gemessen und keine weiteren Nebenprodukte.

Um die Umsatzrate in bioelektrochemischen Systemen zu erhöhen, wurde im Weiteren versucht die Elektrodeninteraktion zu verbessern. Um die Zellyse von *S. oneidensis* unter Stressbedingungen zu verringern, wurde zum einen die Deletion der drei Prophagen λ -Phage, MuSo1 und MuSo2 getestet. Hierbei zeigte sich mit der Deletion des λ -Phagen aus Vorarbeiten eine gesteigerte Stromproduktion und erhöhte Lebendzellzahl auf der Anode. Die weiteren Deletionen führten zu keiner weiteren Steigerung der Stromproduktion.

Neben der biologischen Verbesserung der Elektrodeninteraktion sollten ebenfalls die Elektrodenmaterialien auf eine bessere Interaktion ausgelegt werden. Hierzu wurden elektrogewebene Materialien der AG Kerzenmacher mit verschiedenen Stämmen getestet um eine Steigerung der Stromproduktion zu erzielen. Mit Steigerung der Stromproduktion geht in der Regel eine verbesserte Umsetzung des Substrates einher. Um die Produktausbeute zu erhöhen und möglichst reine Produkte zu erzielen, wurden die Acetatkinase- und Phosphotransacetylase-Deletionsmutanten in diesen Setups verwendet. In parallelen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass dies zu einem Einbruch in der Stromproduktion führte. Daraufhin wurden weitere Experimente durchgeführt um die Stromproduktion zu erhöhen und so das Nutzen von elektrogewebtem Material zu gewährleisten.

Um die metabolische Fitness der *ackA/pta*-Mutante zu verbessern, wurde mit Potentialwechseln gearbeitet. Bei diesem Experiment stellte sich heraus, dass das Anlegen eines hohen Potentials (+500 mV gegen NHE) über 4 Stunden und über 20 Stunden das gewohnte Potential von 0 mV gegen NHE zu einer durchschnittlichen Stromdichte von 12,99 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ führte und zu einer Acetoinausbeute von etwa 50%. Dies stellte eine Steigerung im Vergleich zu Experimenten mit konstantem Potential bei 0 mV gegen NHE mit 32% Acetoinausbeute dar.

Als weitere Strategie zur Erhöhung der Stromdichte wurde eine Cokultivierung mit *Geobacter sulfurreducens* versucht. *G. sulfurreducens* ist in der Lage viel höhere Stromdichten zu generieren, da er dicke und leitfähige Biofilme auf den Anoden zu bilden vermag. Die Hypothese war daher, dass Acetoin-produzierende *S. oneidensis*-

Zellen eventuell in dieses Netzwerk eingeflochten werden könnten. Hierbei wurden zunächst durchschnittliche Stromdichten von 214,69 und 237,19 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen.

Da in diesen Versuchen keine Acetoinproduktion gemessen werden konnte, wurden die Ansätze unter verschiedenen Bedingungen wiederholt. Zum einen wurde es mit Vorinduktion und zum anderen zusätzlich zur Vorinduktion auch die Anwendung der zuvor erfolgreichen Potentialshifts versucht. Hierbei zeigte sich bei konstanten Potential eine durchschnittliche Stromdichte von 206,61 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ und einer geringen Acetoinproduktion von 8,6% des theoretischen Maximums. Im Experiment mit einem Potentialwechsel wurde eine durchschnittliche Stromdichte von 283,19 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen und 4,4% Acetoin des theoretischen Maximums detektiert.

V. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
AckA	Acetatkinase
AlsD	Acetolaktat-Decarboxylase
AlsS	Acetolaktat-Synthase
BEC	Bioelektrochemische Zellen (engl.: <i>Bioelectrochemical Cell</i>)
BES	Bioelektrochemische Systeme (engl.: <i>Bioelectrochemical Systems</i>)
BudC	Buandiol-Dehydrogenase
CelA	Cellobiase (β -1,4-Glyoxalase)
Celstrep	Cellulase
CymA	Cytoplasmatisches Protein A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Δ	Delta (Zeichen für die Deletion von Genen)
e^-	Elektron
FccA	Fumaratreduktase
g	Gramm
GlpF	Glycerintransporter
GlpK	Glycerinkinase
GpsA	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
H⁺	Proton
HchA	Glyoxalase III
HP	Hohes Potential (engl.: <i>High potential</i>)
l	Liter
LP	Niedriges Potential (engl.: <i>Low potential</i>)
MFC	Mikrobielle Brennstoffzelle (engl.: <i>Microbial Fuel Cell</i>)
MgsA	Methylglyoxalsynthase
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar

Abkürzung	Erläuterung
μA	Mikroampere
mA	Milliampere
MtrABC	Metal reduzierendes Protein ABC
MtrF	Metal reduzierendes Protein F
NHE	Normal Wasserstoff Elektrode (engl.: <i>Normal Hydrogen Electrode</i>)
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
Pta	Phosphotransacetylase
PS	Potentialswitch
PtcCAB	Cellobiose-Transporter
RNA	Ribonukleinsäure
RpoA	RNA-Polymerase A
SHE	Standard Wasserstoff Elektrode (engl.: <i>Standard Hydrogen Electrode</i>)
STC	Small tetraheme Cytochrome
xg	Rotorbeschleunigung bei Zentrifugen

VI. Inhaltsverzeichnis

I.	Eidesstattliche Erklärung.....	4
II.	Danksagung.....	5
III.	Publikationen und Konferenzbeiträge	6
IV.	Zusammenfassung.....	7
V.	Abkürzungsverzeichnis	10
VI.	Inhaltsverzeichnis.....	12
1	Einleitung	15
1.1	Exoelektrogene Organismen.....	15
1.1.1	Dissimilatorische Eisenreduktion.....	15
1.1.2	<i>Shewanella oneidensis</i>	15
1.1.3	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	19
1.2	Mikrobielle Brennstoffzellen	19
1.2.1	Graphitvlies	20
1.2.2	Elektrogesponnenes Material.....	20
1.3	Energiestoffwechsel	21
1.3.1	Atmung.....	21
1.3.2	Gärung.....	22
1.3.3	Thermodynamische Hierarchie	23
1.3.4	Elektro-Fermentation.....	23
1.4	Metabolic engineering	24
1.4.1	Cellulose, Cellobiose und Glucose.....	24
1.4.2	Glycerin	27
1.4.3	Acetoin und Butandiol	28
2	Zielsetzung.....	30
3	Material und Methoden	31
3.1	Stämme.....	31

3.2	Plasmide	35
3.3	Primer.....	38
3.4	Medien	47
3.4.1	Lysogeny-Broth-Medium (LB)	47
3.4.2	Medien zur Anzucht von <i>Shewanella oneidensis</i>	47
3.4.3	Medium für die Anzucht von <i>Geobacter sulfurreducens</i>	51
3.4.4	Medien für bioelektrochemische Zellen.....	54
3.5	Molekularbiologische Methoden	57
3.5.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	57
3.5.2	Isolation und Reinigung von DNA	59
3.5.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA mit Agarose-Gelen	60
3.5.4	Aufreinigung von PCR-Produkten bzw. DNA aus einem Agarose-Gel	61
3.5.5	Klonierung mittels isothermaler Ligation	61
3.5.6	Herstellen von Deletionsvektoren.....	63
3.5.7	Herstellen von Vektoren für die Integration der Produktionsgene	63
3.5.8	Deletion der Acetatsynthese-Gene und Integration von <i>budC</i>	64
3.6	Transformationsmethoden	64
3.6.1	Elektroporation	65
3.6.2	Konjugation	66
3.7	Realtime PCR und quantitative PCR.....	67
3.7.1	Realtime-PCR	67
3.7.2	Quantitative PCR	69
3.8	Analytik.....	70
3.8.1	HPLC	71
3.8.2	Glycerin-Bestimmung.....	71
3.8.3	Optische Dichte.....	72
3.8.4	Acetoin-Bestimmung	72

3.9	Wachstumskurven und Zellsuspensionsassays	73
3.10	Bioelektrochemische Zellen (BEZ)	73
3.10.1	Aufbau der BEZ.....	73
3.10.2	Vorbereitung der Bakterien	74
4	Ergebnis	76
4.1	Elektrodenperformance	76
4.1.1	Biologische Modifikationen.....	76
4.1.2	Materialanpassungen	77
4.2	Metabolic Engineering.....	77
4.2.1	Acetoin- und Butandiolproduktion	78
4.3	Bioelektrochemische Zellen	83
4.4	Glycerinstoffwechsel	99
4.5	Cellulosestoffwechsel.....	106
5	Diskussion.....	113
5.1	Elektrodenperformance	113
5.2	Metabolic Engineering.....	114
5.2.1	Cellulosestoffwechsel.....	114
5.2.2	Glycerinstoffwechsel	116
5.2.3	Acetoin- und Butandiolstoffwechsel	118
5.3	Ausblick.....	126
6	Literatur.....	128
7	Anhang.....	136
7.1	Darstellung des beruflichen und wissenschaftlichen Werdegangs	136

1 Einleitung

In 40 bis 50 Jahren ist Erdöl als fossiler Rohstoff wohl nicht mehr zu angemessenen Preisen verfügbar (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 2010). Fossile Brennstoffe werden nicht nur für die Herstellung von Kraftstoffen eingesetzt, sondern auch als Grundlage für die Synthese von Kunststoffen etc. Da die wachsende Weltbevölkerung einen höheren Bedarf an Energie und Wertstoffen aufweist, als aus den verbleibenden Ressourcen möglich ist, wird nach alternative Wegen zur Energiebereitstellung und Herstellungsgrundlagen gesucht. Ein Ansatz hierfür ist die Produktion biobasierter Stoffe und die Anwendung von bioelektrochemischen Systemen. Letztere ermöglichen neben Abwasser-Aufreinigung zum Beispiel auch die Produktion von Strom durch diverse Mikroorganismen, die man als exoelektrogen bezeichnet.

1.1 Exoelektrogene Organismen

Exoelektrogene Organismen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit, aus Elektronen aus der Atmungskette über die Membran nach außen zu transportieren und im Folgenden Elektronenakzeptoren außerhalb der Zelle zu reduzieren. Bekannte Vertreter stammen aus der Familie der Proteobakterien z.B. *Geobacter sulfurreducens*, *G. metallireducens*, oder auch *Shewanella oneidensis*.

1.1.1 Dissimilatorische Eisenreduktion

Sedimentbakterien, wie *Shewanella oneidensis* sind oft zur dissimilatorischen Eisenreduktion (engl.: *dissimilatory iron reduction* (DIR)) befähigt, was eine Reduktion von unlöslichen Eisenformen außerhalb der Zelle bezeichnet. Hierbei werden unlösliche Eisen(III)-Formen in lösliche Eisen(II)-Formen reduziert (Lovley, 1991). Dies ermöglicht ein erweitertes Spektrum an Elektronenakzeptoren für die zur dissimilatorischen Eisenreduktion befähigten Organismen. Eine ubiquitär vorliegende Substanz wie Eisen nutzen zu können, bietet einen Vorteil im Sediment.

1.1.2 *Shewanella oneidensis*

Shewanella oneidensis MR-1, ein Gram-negatives γ -Proteobakterium, wurde 1988 im Lake Oneida, USA als Sedimenbakterium isoliert (Venkateswaran *et al.*, 1999). Das stäbchenförmige Bakterium wächst optimal bei 30°C unter oxischen und anoxischen Bedingungen (Venkateswaran *et al.*, 1999). Als Elektronendonator kann *S. oneidensis*

z.B. Laktat oder N-Acetylglucosamin (NAG) nutzen. Während ein breites Spektrum an Elektronenakzeptoren genutzt werden kann, ist *S. oneidensis* nicht in der Lage zu gären (Serres and Riley, 2006).

Da *S. oneidensis* zur DIR befähigt ist, dient diese Art als Modellorganismus in der mikrobiellen Brennstoffzellenforschung. Für den Elektronentransport aus dem Cytoplasma in den extrazellulären Raum besitzt *S. oneidensis* ein komplexes Proteinnetzwerk (Abbildung 1).

Die Enzyme der Atmungskette sind in die Cytoplasmamembran (CM) eingelagert (Fonseca *et al.*, 2013). Hierbei werden die Elektronen aus der Oxidation von Kohlenstoffquellen in den Quinon-Pool eingespeist und damit ein Protonengradient aufgebaut. Mit diesem kann die ATP-Synthase ATP bilden.

S. oneidensis nutzt ein das Periplasma durchspannendes Proteinnetzwerk um die Elektronen aus der Atmungskette in den ER zu transportieren (Fonseca *et al.*, 2013). Hierbei dient CymA (engl.: **C**ytoplasmic protein **A**) als Elektronendistributor und verteilt die Elektronen an STC (engl.: **S**mall **T**etra**h**eme **C**ytochrome), FccA (Fumaratreduktase) oder MtrA (engl.: **m**etal **r**educing protein **A**) (Myers and Myers, 1997). MtrA ist Teil des drei Komponentenkomplexes MtrABC, welcher in einer 1:1:1 Stöchiometrie vorliegt. (Ross *et al.*, 2007). MtrB ist hierbei, ein in die äußere Membran eingelagertes, β -Fass-Protein, das den Kontakt von MtrA mit der terminalen Reduktase MtrC ermöglicht, welche außerhalb der Zelle, in die äußere Membran über einen Lipidanker befestigt ist (Ross *et al.*, 2007; Hartshorne *et al.*, 2009). Das ebenfalls in der äußeren Membran lokalisierte OmcA (engl.: **o**uter **m**embrane **c**ytochrome **A**) kann die Elektronen von MtrC aufnehmen und ebenso auf einen terminalen Elektronenakzeptor übertragen (Shi *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2007). *S. oneidensis* besitzt insgesamt 42 potentielle Gene für Cytochrome (Meyer *et al.*, 2004). Homolog zum MtrABC-Komplex ist der MtrDEF-Komplex, zusätzlich besitzt *S. oneidensis* den DmsEFAB-Komplex für die DMSO-Atmung (Gralnick *et al.*, 2006).

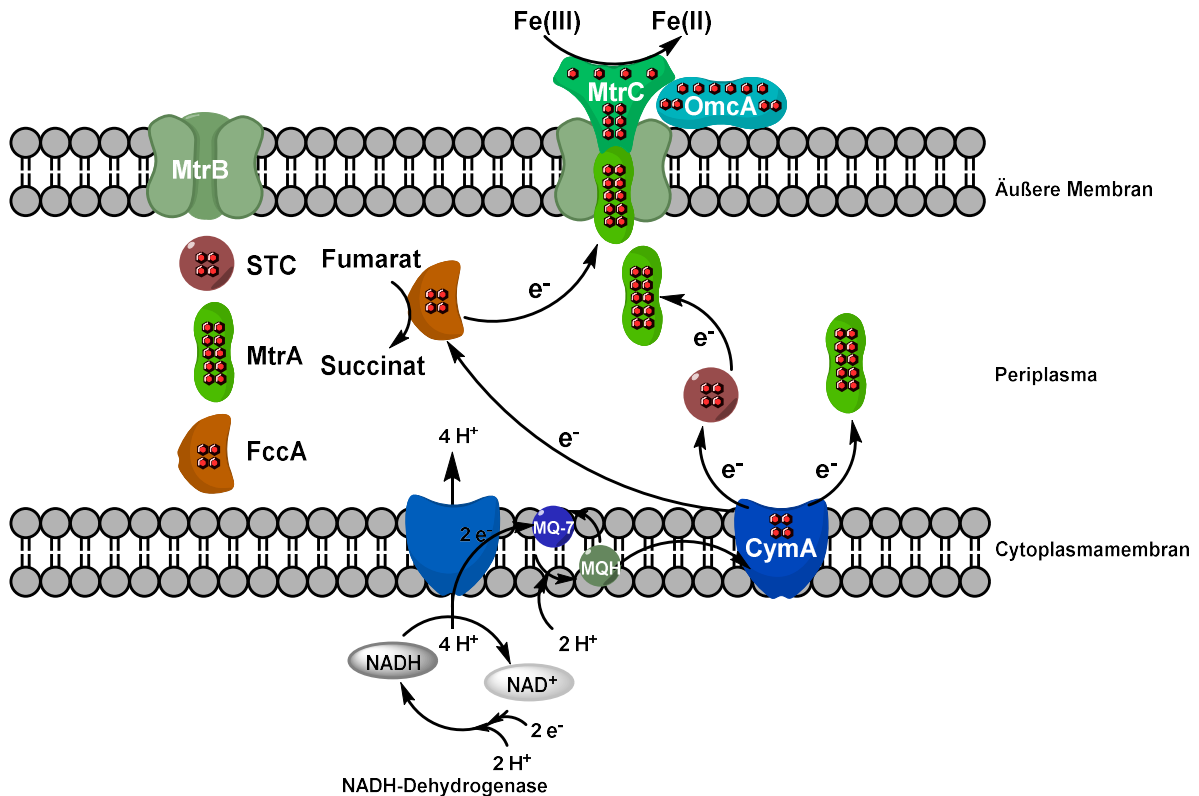


Abbildung 1: Proteinnetzwerk im Periplasmaraum von *S. oneidensis*. CymA erhält die Elektronen aus dem Menachinon-Pool in der Cytoplasmamembran und agiert als Elektronenverteiler. Die Übertragung kann auf FccA, STC oder MtrA erfolgen. MtrA bildet zusammen mit MtrBC einen Proteinkomplex, der die Elektronen aus dem Periplasma nach außen transportiert. Hierbei ermöglicht das β -Fass-Protein MtrB den Kontakt zwischen MtrA und der terminalen Reduktase MtrC. MtrC überträgt die Elektronen auf einen terminalen Elektronenakzeptor oder OmcA. OmcA ist, wie MtrC ebenfalls über einen Lipidanker in der äußeren Membran befestigt und zur Übertragung auf terminale Elektronenakzeptoren befähigt (Abbildung nach Richter *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2013)

S. oneidensis sekretiert Flavine (hauptsächlich Riboflavin und Flavinmononukleotid (FMN)) in das umgebende Medium (Von Canstein *et al.*, 2008; Kotloski and Gralnick, 2013). FMN wird durch die 5'-Nukleotidase UshA aus Flavinadenindinukleotid (FAD) durch die Abspaltung von AMP gebildet (Kotloski and Gralnick, 2013). Hauptsächlich wird FMN während der Wachstumsphase und Riboflavin während der stationären Phase gebildet (Von Canstein *et al.*, 2008). Jedes Flavinmolekül ermöglicht, als sogenanntes Elektronenshuttle, durch die Übertragung von zwei Elektronen die Reduktion von zwei Molekülen Eisen(III)-Oxid (Von Canstein *et al.*, 2008). Außerdem spielen Flavine zusätzlich eine Rolle in der Übertragung von Elektronen in bioelektrochemischen Systemen. In Marsili *et al* (2008) konnte gezeigt werden, dass nach Tauschen des Mediums in einer mikrobiellen Brennstoffzelle (engl.: **Microbial Fuel Cell** (MFC)) der Strom zunächst abfiel. Hierbei stellte sich für die Autoren die Frage, ob eine lösliche Komponente den Elektronentransfer der adhären Zellen ermöglicht oder die planktonischen Zellen den Hauptbestandteil am Elektronentransfer

leisten (Marsili *et al.*, 2008). Als sie das ursprünglich abgenommene Medium zellfrei zurück in die Reaktoren gaben, erhielten sie 94% des zuvor erreichten Stroms (Marsili *et al.*, 2008).

Während *S. oneidensis* unter oxidischen Bedingungen den Citratzyklus (engl.: *tricarboxylic acid cycle* (TCA-Cycle)) nutzt um das Substrat vollständig zu CO₂ umzusetzen, ist unter anoxischen Bedingungen nur ein unvollständiger Citratzyklus möglich, wobei kein Succinyl-CoA gebildet wird (Abbildung 2) (Tang *et al.*, 2007; Flynn *et al.*, 2012). Hierbei ist SucAB unter anaeroben Bedingungen nicht ausreichend exprimiert (Beliaev *et al.*, 2002). Unter anoxischen Bedingungen wird aus Pyruvat Acetat und Formiat gebildet. Die Energiegewinnung findet unter anoxischen Bedingungen hauptsächlich durch die Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA unter Bildung von ATP statt (Tang *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2010; Brutinel and Gralnick, 2012).

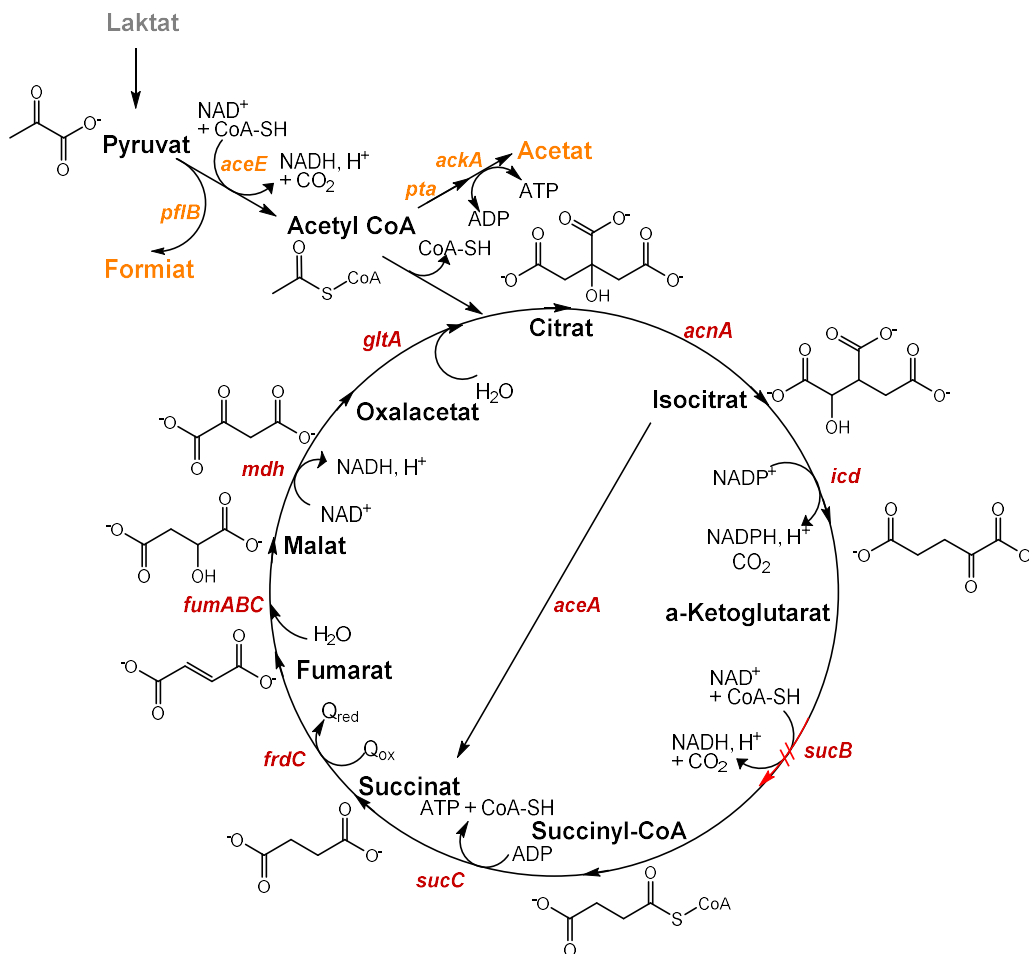


Abbildung 2: Citratzyklus von *S. oneidensis*. Unter anoxischen Bedingungen läuft ein unvollständiger Citratzyklus ab, es wird kein Succinyl-CoA gebildet (rote Pfeile). In rot sind die beteiligten Gene dargestellt. (Abbildung nach Flynn *et al.*, 2012; Brutinel and Gralnick, 2012)

1.1.3 *Geobacter sulfurreducens*

Das Gram-negative, obligat anaerobe Bakterium *Geobacter sulfurreducens* ist ein weiterer Organismus der eine verlängerte Elektronentransportkette besitzt und so Elektronen auf Akzeptoren außerhalb der Zelle übertragen kann (Caccavo *et al.*, 1994). *G. sulfurreducens* besitzt 111 c-Typ Cytochrome, welche dies ermöglichen (Méthé *et al.*, 2003). Zehn Cytochrome sind an diesem Transport hauptsächlich beteiligt (Santos *et al.*, 2015). Zu diesen zählt MacA, welches in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, außerdem die im Periplasma vorliegenden Komponenten PpcA-E und GSU1996, sowie OmcF, OmcS und OmcZ die in der äußeren Membran verankert sind (Richter *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015). Vergleichbar zu CymA aus *S. oneidensis* nimmt MacA Elektronen aus dem Menaquinonpool auf und verteilt diese auf die im Periplasma lokalisierten Komponenten. Ein weiterer funktioneller Vergleich kann zwischen dem *Shewanella*-MtrABC-System und dem *Geobacter*-Komplex aus dem im Periplasma lokalisierten OmaB/C, dem porinähnlichen OmbB/C und dem in der äußeren Membran lokalisierten OmcB/C gezogen werden (Santos *et al.*, 2015). Zusätzlich bildet *G. sulfurreducens* Pili aus die ebenfalls leitfähig sind und bei der Anheftung an die Anode eine Rolle spielen. *G. sulfurreducens* bildet im Gegensatz zu *S. oneidensis* Multilayer-Biofilme auf der Anode (Reguera *et al.*, 2006). *G. sulfurreducens* setzt Acetat als Substrat zu CO₂ und H₂ um und kann aufgrund dieser Eigenschaft auch in anaeroben Cokultivierungen mit *S. oneidensis* eingesetzt werden (Caccavo *et al.*, 1994).

1.2 Mikrobielle Brennstoffzellen

Exoelektrogene Organismen können in mikrobiellen Brennstoffzellen zum Einsatz kommen. Es gibt verschiedene Typen von Brennstoffzellen, die den unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Organismen angepasst sind. In der Regel besitzt ein solches bioelektrochemisches System eine Anode und eine Kathode.

Diese können sowohl in Zwei-Kammer-Systemen, also getrennt voneinander oder gemeinsam angeordnet sein. Bei der Trennung wird eine semipermeable Membran eingesetzt, die z.B. die Diffusion der entstandenen Protonen von der Anodenseite auf die Kathodenseite ermöglicht (Liu and Logan, 2004; Rabaey and Verstraete, 2005). Zusätzlich zu Mikroorganismen die Elektronen von einer Kathode aufnehmen um Stoffe zu synthetisieren, gibt es Organismen die Elektronen an eine Anode abgeben

um Kohlenstoffquellen ab- oder umzubauen. In dieser Arbeit wurde mit den Anoden-atmenden Organismen *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* gearbeitet. Beide Modellorganismen oxidieren die zugegebenen Kohlenstoffquellen und geben die daraus gewonnenen Elektronen an die Anode ab. Die Anode dient in diesem Aufbau als ein nicht-erschöpfbarer Elektronenakzeptor. Des Weiteren wird das Anodenkompartiment mit N_2 oder N_2/CO_2 begast um Sauerstoff als konkurrierenden Elektronenakzeptor auszuschließen. Die Kathode ist in diesem Aufbau ein Platinnetz das über Platindraht an den Potentiostaten angeschlossen ist. Als Anode können verschiedene Kohlenstoffmaterialien dienen, wie Graphitvlies, C-TEX oder elektrogewebenes Material. Hierbei unterscheiden sich die Materialien in Oberfläche und/oder Aktivierung. Da in dieser Arbeit nur mit Graphitvlies und elektrogewebtem Material gearbeitet wurde, werden diese im Folgenden genauer beschrieben.

1.2.1 Graphitvlies

Das in dieser Arbeit verwendete Graphitvlies GFD 2,5 von SIGRACELL besitzt eine Dicke von 2,5 mm und eine Dichte von $0,09 \text{ g/cm}^3$. Polyacrylnitril (PAN) dient als Ausgangsstoff für dieses Gewebe. Vorteile des Graphitvlieses umfassen die Leichtigkeit in der Anwendung, den geringen Eigenwiderstand, eine praktische Unlöslichkeit und eine Toleranz gegen hohe Temperaturen (SGL CARBON GmbH, n.d.). Dies ermöglicht es das Graphitvlies vor der Anwendung zu autoklavieren.

1.2.2 Elektrogewebenes Material

Mit der Elektrospinning-Technik können Nanofasergewebe mit skalierbarer Porosität und Faserdurchmesser produziert werden (Dong *et al.*, 2011). Mittels nachfolgender Carbonisierung können diese unter Luftabschluss in elektrisch leitfähige Elektrodenmaterialien prozessiert werden können.

Auf eine Spritze mit Polymerlösung wird ein elektrisches Feld angelegt, dadurch entsteht durch die auf die Polymerlösung ausgeübte Zugkraft über eine kurze Konus-Formung ein dünner Faden (Dong *et al.*, 2011). Der entstehende sehr dünne Polymerfaden trocknet bis zum Eintreffen auf den walzenförmigen Kollektor aus und bildet dort ein feinmaschiges Geflecht (Kim, 2005). Der Polymerfaden kann durch das Drehen des Kollektors gleichmäßig auf einer Fläche verteilt werden. Anschließend führt die in einem Ofen bei Temperaturen von bis zu 1100°C unter Sauerstoffausschluss stattfindende Pyrolyse zu einer Carbonisierung des Geflechts

(Zussman *et al.*, 2005). Vorteile dieses Gewebes sind die große Oberfläche, hohe Porosität und eine gute Vernetzung (Ding *et al.*, 2010). Ein Nachteil ist die Brüchigkeit des Materials was eine vorsichtige Handhabung voraussetzt.

1.3 Energiestoffwechsel

Energiestoffwechsel, wie Photosynthese, Atmung oder Gärung haben gemein, dass ATP als universelle Energieeinheit zu Verfügung gestellt wird.

1.3.1 Atmung

Unter Atmung versteht man den Transfer von Elektronen auf einen terminalen Elektronenakzeptor innerhalb oder außerhalb der Zelle. Werden die Elektronen auf Sauerstoff übertragen, wird dies als aerobe Atmung bezeichnet. Beim oxidischen Abbau von Kohlenstoffquellen wird beispielsweise der Citratzyklus zu Energiegewinnung genutzt. Hierbei dient Acetyl-CoA als zentrales Intermediat welches z.B. aus der Glykolyse in den Citratzyklus einspeist wird. Es entstehen als Stoffwechselendprodukte hauptsächlich CO₂ und H₂O (Fuchs *et al.*, 2007).

Die Atmungskette ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert und dient der Translokation von Protonen über die Membran (Abbildung 3). Es entsteht ein elektrochemischer Gradient, welcher durch die ATP-Synthase genutzt werden kann um ATP herzustellen (Fuchs *et al.*, 2007). Verschiedene Reduktionsäquivalente wie Nicotinamidadenindinukleotid (NAD/NADH), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP/NADPH) oder auch Flavinadenindinukleotid (FAD/FADH) übertragen Elektronen auf diverse Komplexe. So überträgt z.B. NADH zwei Elektronen auf die NADH-Dehydrogenase in der Cytoplasmamembran. Die NADH-Dehydrogenase, Komplex I der Atmungskette, gibt die Elektronen an den Ubiquinon-Pool ab, hierbei werden vier Protonen über die Membran transloziert. Komplex III, die Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, transferiert die Elektronen auf Cytochrom c, welches diese wiederum auf die Cytochrom-c-Oxidoreduktase abgibt. Durch beide Enzymkomplexe werden jeweils zwei weitere Protonen durch die Membran transportiert. Komplex IV reduziert den terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff mit Elektronen und Protonen zu Wasser. Die translozierten Protonen werden von der ATP-Synthase nach innen gepumpt um dabei ATP zu synthetisieren.

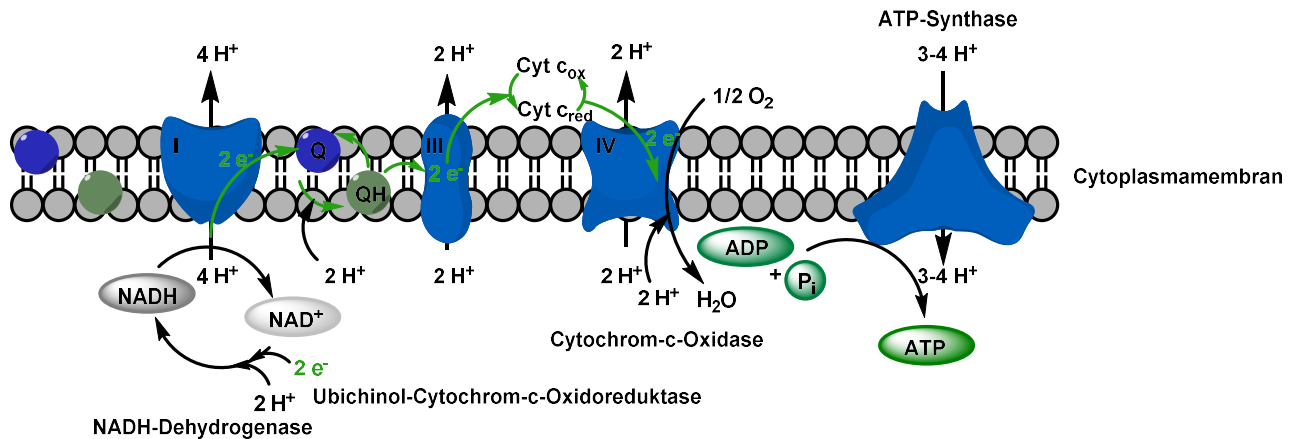


Abbildung 3: Schema der Atmungskette mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor (Abbildung nach: Fuchs *et al.*, 2007) Die beteiligte Enzymkomplexe sind in Blau abgebildet. Der Elektronenfluss ist in grün und die Protonen in schwarz dargestellt. Die aus den Abbaureaktionen im Zellinneren auf NAD übertragenen Elektronen werden über die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) in die Atmungskette eingespeist. Die Quinone übernehmen die Elektronen und transferieren diese auf die Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III). Zu diesem Zeitpunkt wurden bereits sechs Elektronen über die Membran geschleust. Der Transfer der Elektronen findet nun mittels Cytochrome auf die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) statt. Komplex IV überträgt die Elektronen auf Sauerstoff und reduziert diesen zu Wasser. Die ebenfalls in der Cytoplasmamembran lokalisierte ATP-Synthase bildet aus ADP mit P_i ATP, dabei pumpt sie 3-4 Protonen zurück in das Cytoplasma.

Als weitere terminale Elektronenakzeptoren können z. B. Nitrat, Schwefel, Eisenformen und auch Fumarat dienen. Hierbei spricht man, da es unter Ausschluss von Sauerstoff stattfindet, von anaerober Atmung.

1.3.2 Gärung

Im Falle der Gärung ist im Medium kein terminaler Elektronenakzeptor vorhanden. Bakterien, wie *Escherichia coli* nutzen die gemischte Säuregärung zur Energiegewinnung (Abbildung 4). Hierbei entstehen verschiedene Produkte wie Laktat, Acetat oder auch Ethanol. Aufgrund der Redox-Balance ist das gemischte Produktspektrum notwendig, da die Oxidationsstufe des Substrates der der gebildeten Produkte entsprechen muss. Zusätzlich müssen Reduktionsäquivalente regeneriert werden. Dabei werden die reduzierten Reduktionsäquivalente NADH über Reduktion von z.B. Pyruvat zu NAD oxidiert.

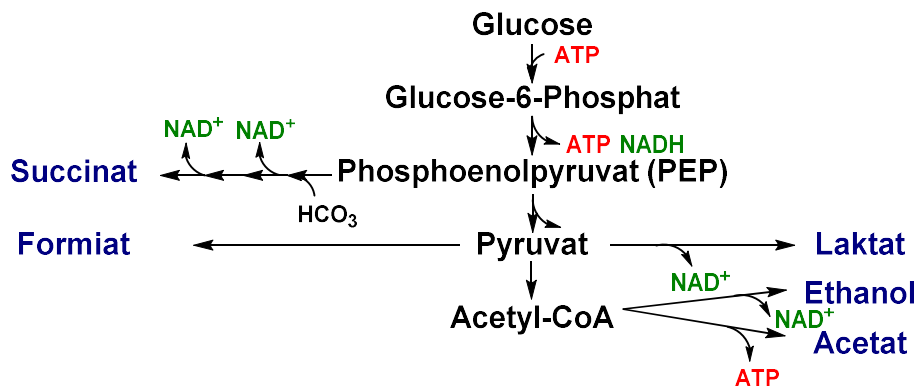


Abbildung 4: Gemischte Säuregärung von *E. coli*. In blau sind die Produkte dargestellt (Laktat (C3), Ethanol (C2), Acetat (C2), Formiat (C1) und Succinat (C4)). In grün die beteiligten Reduktionsäquivalente und in rot das ATP (Abbildung nach Förster and Gescher, 2014).

1.3.3 Thermodynamische Hierarchie

Unter thermodynamischer Hierarchie versteht man das Nutzen mehrerer Energiequellen bzw. Elektronenakzeptoren durch Bakterien nach der Reihenfolge der effizientesten Nutzung (Tran and Unden, 1998; Goh *et al.*, 2005; Sturm *et al.*, 2015). Hierbei wird beispielsweise die Atmung mit Sauerstoff, der Atmung mit Nitrat sowie der Gärung vorgezogen, begründet durch die Redoxpotentiale der Produkte und Edukte. So wird im Falle des Bakteriums *E. coli* zunächst Sauerstoff als Elektronenakzeptor bevorzugt, gefolgt von z.B. Nitrat oder Fumarat. Falls keine Elektronenakzeptoren vorhanden sind stellt *E. coli* auf Gärungsstoffwechsel um (Fuchs *et al.*, 2007).

1.3.4 Elektro-Fermentation

In aktuellen Studien werden vermehrt Elektro-Fermentationen beschrieben (Abbildung 5).

Die Summe der Oxidationsstufen der Produkte entspricht in einer herkömmlichen Fermentation dem Oxidationslevel der Edukte. In einer Elektro-Fermentation ist es möglich dies über das Nutzen eines nicht erschöpfbaren Elektronenakzeptors, wie einer Anode, zu entkoppeln.

Die überzähligen Elektronen werden auf eine Anode übertragen und ermöglichen dadurch die Produktion eines weniger reduzierten Produktspektrums. Zudem ist es so möglich das gemischte Produktspektrum auf ein einziges Produkt zu reduzieren und so eine höhere Reinheit zu erzielen.

Ansatz ist die Umstellung auf eine biobasierte Industrie (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 2010).

Im Jahr 2009 wurden in Deutschland auf rund zwei Mio. Hektar nachwachsende Rohstoffe angebaut. Dies entspricht laut dem Bundesministerium für Forschung etwa 17 Prozent der Ackerflächen Deutschlands. Ein Drittel der Fläche werden weiterhin für den Holzanbau genutzt (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 2010).

Ausgangstoff für biobasierte Produkte ist Biomasse, als eine erneuerbare kohlenstoffhaltige Rohstoffquelle (Cherubini *et al.*, 2009). Als Biomasse können verschiedene Pflanzen und Bäume eingesetzt werden. Biomasse besteht aus energiereichen Polysaccharid-Biopolymeren wie Stärke, Chitin oder Cellulose die von Pflanzen aus CO₂ mittels Photosynthese hergestellt werden (Ahmad *et al.*, 2013).

Da Cellulose das am häufigsten vorkommende organische Molekül auf der Erde ist (Lynd *et al.*, 2002; Jarvis, 2003), liegt ebenso Interesse vor Cellulose als Substrat für Bakterien zugänglich zu machen und dabei ein Produkt der Wahl zu erzeugen. Allerdings bringt dies in der Anwendung in einem bioelektrochemischen System einige Probleme mit sich. Es sind momentan wenige Organismen bekannt die anaerob diese Biopolymere spalten können. Dabei ist die schwierige Zersetzung und der knappe ATP-Haushalt, die laut Lynd *et al.* (2002) über die Produktion der Enzyme für den Abbauweg hinaus gehen eine Herausforderung (Lynd *et al.*, 2002). Hierbei werden zusätzlich die spezifische Aktivität der Cellulasen, die Anheftung des Bakteriums an das Substrat, aber auch die Kopplung von Phosphorylierung und Hydrolyse der glykosidischen Bindungen genannt. Die Autoren ziehen ebenfalls einen Energieeffizienten Substrat-Transport in Erwägung (Lynd *et al.*, 2002).

Bakterien, die Cellulose anaerob verwerten können, wie z.B. *Clostridium cellolyticum* sind in der Regel nicht exoelektrogen (Ren *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2013). In Ren *et al.* (2013) wurde mit einer Cokultivierung mit *G. sulfurreducens* und *C. cellolyticum* in einer mikrobiellen Brennstoffzelle Strom produziert und Cellulose abgebaut. Keiner der Organismen alleine zeigte eine Stromproduktion unter diesen Bedingungen (Ren *et al.*, 2007).

Die meisten Biopolymere sind, wie Cellulose in Wasser un- oder schwer löslich und damit als Substrat erschwert einsetzbar. Da Polysaccharide mehrere Sekundär- als

auch Tertiärstrukturen ausbilden, wird die Zugänglichkeit als Substrat zusätzlich erschwert (Ahmad *et al.*, 2013). Dies erfordert eine Vorbehandlung der Stoffe um eine Zugänglichkeit zu erreichen. Im Folgenden wird vor allem auf Cellulose und Cellobiose eingegangen, da sie in den experimentellen Aufbauten als Substrate eingesetzt wurden.

Cellulose ist ein aus Cellobiose-Untereinheiten aufgebautes Polymer (Abbildung 6). Bei Cellobiose handelt es sich um zwei β -1,4-glycosidisch-verknüpfte Glucose-Monomere. Cellulose ist ein schwer verwertbarer Rohstoff der das Zusammenspiel mehrerer Enzyme benötigt. Hierbei kommen zunächst Endo- und Exocellulasen zum Einsatz. Die Exocellulasen spalten von den Enden Cellobiose-Untereinheiten ab. Endocellulasen unterstützen die Exocellulasen indem sie die Cellulose in kleinere Fragmente unterteilen und somit mehr Enden zur Verfügung stellen. Die Cellobiose-Untereinheiten werden durch Cellobiasen, auch β -1,4-Glucosidasen, in Glucose-Monomere gespalten. Glucose kann von vielen Bakterien, wie *E. coli*, *Lactococcus lactis* oder *Bacillus subtilis* als Substrat genutzt werden und durchläuft dabei den für die Bakterien jeweils spezifischen Abbauweg wie z.B. die Glykolyse oder den Entner-Doudoroff-Weg.

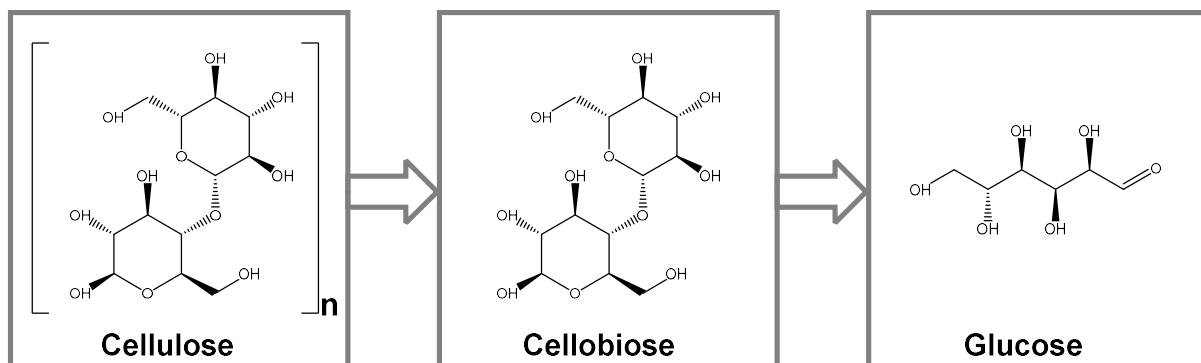


Abbildung 6: Aufbau von Cellulose. Cellulose ist ein aus Cellobiose-Untereinheiten aufgebautes Polymer. Bei Cellobiose handelt es sich um zwei β -1,4-glycosidisch-verknüpfte Glucose-Monomere.

Obwohl *S. oneidensis* Glucose nicht als primäres Substrat nutzt, kann durch eine Adaptierung Glucose verstoffwechselt werden. Durch eine Deletion des Repressors (NagR) des N-Acetylglucosamin-Abbauweges (NAG) aus dem Genom, wodurch das N-Acetylglucosamin-Operon exprimiert wird, wird *S. oneidensis* dazu befähigt das nicht primäre Substrat Glucose zu verstoffwechseln. NAG ist ein energiereiches Glucoseanalogon und kann von *S. oneidensis* nativ umgesetzt werden (Chubiz and Marx, 2017). Durch den Verlust von NagR wird das Operon konstitutiv exprimiert, wodurch Glucose aerob umgesetzt werden kann. Chubiz *et al.* (2017) wiesen nach,

dass für diesen Prozess der NAG-Transporter (NagP) und die NAG-Kinase (NagK) benötigt werden, da sie die Aufnahme und Phosphorylierung von Glucose ermöglichen. Über eine C¹³-Analyse konnte der Abbau von Glucose über den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg (ED) nachgewiesen werden (Chubiz and Marx, 2017).

Für einen anaeroben Glucose-Umsatz wurden von Nakagawa *et al.* (2015) die Glucosekinase (GlcK) und ein Glucose/Galactose-Proton-Symporter (GalP) zusätzlich eingebracht (Nakagawa *et al.*, 2015). Hierbei zeigte sich Wachstum unter Fumarat-atmenden jedoch nicht unter gärenden Bedingungen. Allerdings ist die Umsetzung unter anoxischen Bedingungen langsamer als unter oxidischen (Nakagawa *et al.*, 2015). Eine Alternative für Glucoseumsatz in *S. oneidensis*-Kulturen ist eine Co-Kultivierung mit einem Glucose-verstoffwechselndem Organismus wie *Lactococcus lactis*, welcher homofermentativ Laktat bildet (Rosenbaum *et al.*, 2011). *L. lactis* ist nicht nur in der Lage Glucose zu verstoffwechseln, sondern besitzt ebenfalls eine Cellobiase und einen Cellobiose-Transporter für den Abbau von Cellobiose in Glucose (Castro *et al.*, 2009). Zudem zeigt *L. lactis* ähnliche Wachstumsvorlieben wie *S. oneidensis*, wodurch sich dieses Bakterium für die Co-Kultivierung mit *S. oneidensis* sehr gut eignet.

1.4.2 Glycerin

Glycerin fällt zu 10% als Nebenprodukt bei der Biodieselherstellung an (da Silva *et al.*, 2009). Es findet viele Anwendungen wie z.B. in der Kosmetik-, Farb- oder auch Pharmaindustrie (Wang *et al.*, 2001). Da Glycerin ein billiger Rohstoff ist, stellt sich die Frage nach einer Anwendung als Substrat in der Biotechnologie.

Mikroorganismen wie *S. cerevisiae*, *C. acetobutylicum*, *K. pneumoniae* und *E. coli* können Glycerin verstoffwechseln und daraus unterschiedliche Produkte wie 1,3-Propanediol, 2,3-Butandiol oder Ethanol bilden (da Silva *et al.*, 2009). Doch auch genetische Modifikation werden durchgeführt um weiteren Mikroorganismen Glycerin als Substrat zu Verfügung stellen zu können. Experimentell wurde in Flynn *et al.* (2010) eine nicht-stöchiometrische Fermentation von Glycerin in Brennstoffzellen gezeigt, um mit Hilfe von *S. oneidensis* MR-1 Ethanol zu produzieren (Flynn *et al.*, 2010). Hierbei wurde der Glycerinabbauweg aus *E. coli* über ein Plasmid in *S. oneidensis* eingebracht. Das Plasmid enthielt die genetische Information für den Glycerin-Transporter GlpF, die Glycerinkinase (GlpK), Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GlpD) und zusätzlich einer Triose-Isomerase (TpiA). Zur Synthese von Ethanol

wurden wiederum die Gene aus *Zymomonas mirabilis* für die Pyruvatdecarboxylase und die Alkoholdehydrogenase genutzt (Flynn *et al.*, 2010).

1.4.3 Acetoin und Butandiol

Acetoin ist in Werpy *et al.* (2004) als eine der 30 vielversprechendsten Plattformchemikalien aufgeführt (Werpy T., 2004). Acetoin oder auch Hydroxybutanon besitzt einen buttrigen Geruch und wird deshalb z.B. in der Nahrungsmittelindustrie als Aromastoff genutzt. Es dient ebenfalls als Synthesegrundstoff für Pyrazine, welche als Geschmacksstoffe eingesetzt werden können (Xiao and Lu, 2014). Acetoin ist die Vorstufe von Butandiol und wird von vielen Enterobakterien, wie z.B. auch *Klebsiella pneumoniae* gebildet. Außerdem wird Acetoin beispielsweise auch von *Bacillus subtilis* über die Schlüsselenzyme Acetolaktat-Synthase (AlsS) und Acetolaktat-Decarboxylase (AlsD) aus dem Intermediat Pyruvat gebildet (Xiao and Xu, 2007). In aeroben Experimenten zeigte ein *B. subtilis*-Stamm nach Ermöglichen von Xylose-Abbau in einem Glucose-Xylose-Medium einen Ertrag von 0,7 mol/mol (Zucker) (Chen *et al.*, 2013). Durch das Einbringen der Acetoin Gene aus *B. subtilis* in *E. coli* wurde in mikrobiellen Brennstoffzellen-Experimenten eine Ausbeute von 94% aus Glucose erzielt (Förster *et al.*, 2017).

Weiterhin kann aus Acetoin über die Butandiol-Dehydrogenase Butandiol hergestellt werden. Hierbei wird unter Verwendung von NADH Acetoin zu 2,3-Butandiol reduziert, welches als Ausgangsstoff für Butadien dienen kann und auch als Ausgangsstoff für Kunststoffe und Lösungsmittel (Celińska and Grajek, 2009).

B. subtilis besitzt ebenfalls die Butandiol-Dehydrogenase BdhA, welche unter NADH-Verbrauch Acetoin zu Butandiol reduziert. Hierbei zeigten Biswas *et al.* (2012), dass mit Einfügen des *alsSD*-Promoters vor *bdhA* in einer Zwei-Schritt-Fermentation (8 h Sauerstoffzugabe, dann keine weitere Zugabe von Sauerstoff) eine um das Vierfache gesteigerte Butandiolproduktion im Vergleich zum Ausgangsstamm erzielt wurde (Biswas *et al.*, 2012). Unter mikroaerophilen Bedingungen konnte eine um das 6,7-fach gesteigerte Menge an Butandiol im Vergleich zum Ursprungstamm nachgewiesen werden, welches einer Produktivität von 0,4 g (lh)⁻¹ entspricht (Biswas *et al.*, 2012). In einer weiteren Arbeit wurden die Gene *budA* und *budC* aus *K. pneumoniae* in *E. coli* eingebracht und unter aeroben Bedingungen 0.31 g/g_(Glucose) und 0.21 g/g_(Roh-Glycerin) Butandiol produziert (Lee *et al.*, 2012).

Vorteile einer anaeroben Kultivierung sind die verminderten Ertragsverluste durch Zellanabolismus. Hinzukommend muss kein Aufwand betrieben werden um die Kulturen mit Sauerstoff zu begasen.

2 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, das Substrat- und Produktspektrum *S. oneidensis* zu erweitern und über eine verbesserte Elektrodeninteraktion den Umsatz und die Produktivität zu erhöhen.

In dieser Arbeit sollte *S. oneidensis* zum einen den nachwachsenden Rohstoff Cellulose und damit auch Cellobiose und Glucose verstoffwechseln, zum anderen den Abfallstoff Glycerin. Hierbei sollte in *S. oneidensis* der Abbauweg über ein Plasmid eingebracht und im weiteren genomisch integriert werden. Als weiteres sollten diese Abbauwege unter Ausschluss von Sauerstoff funktional sein, um diese Stämme in bioelektrochemischen Systemen anwenden zu können.

Zusätzlich sollte die Elektrodeninteraktion über eine vermehrte Zellzahl von *S. oneidensis* auf der Anode erhöht werden. Dies sollte zum einen über die Deletion von Prophagen geschehen, um die Zelllyse von *S. oneidensis* unter Stressbedingungen zu dezimieren und zum anderen über die Cokultivierung mit *Geobacter sulfurreducens*. *G. sulfurreducens* bildet ein leitfähiges Biofilm-Netzwerk auf der Anode. *S. oneidensis* könnte mit *G. sulfurreducens* interagieren und Elektronen auf z.B. die leitfähigen Pili von *G. sulfurreducens* übertragen.

Neben der biologischen Verbesserung der Elektrodeninteraktion, sollten ebenfalls die Elektrodenmaterialien effizienter gestaltet werden. Hierzu sollten elektrogesponnene Materialien mit verschiedenen Stämmen getestet werden, um eine Steigerung der Stromproduktion zu erzielen. Mit Steigerung der Stromproduktion geht in der Regel eine verbesserte Umsetzung des Substrates einher.

Neben der Erweiterung des Substratspektrums sollte *S. oneidensis* zusätzlich in der Lage sein neben Acetat weitere Produkte herzustellen. In dieser Arbeit sollte der Fokus auf die Produkte Acetoin und Butandiol gesetzt werden, welche vielversprechende Plattformchemikalien sind.

3 Material und Methoden

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma (Deisenhofen), oder Roth (Nürnberg) bezogen.

3.1 Stämme

In dieser Arbeit wurden Stämme der Gattung *E. coli* bei 37°C kultiviert und Stämme der Gattung *Shewanella*, *Lactococcus* und *Geobacter* bei 30°C.

Sämtliche Stämme sind in Tabelle 1 gelistet. Soweit nicht anders vermerkt sind die Gebrauchskonzentrationen für Kanamycin 50 µg/ml (Km) und Ampicillin 100 µg/ml (Amp) mit den jeweiligen Abkürzungen vermerkt. Einige Stämme haben eine Auxotrophie für 2,6-Diaminopimelinsäure. Diese sind mit DAP gekennzeichnet. DAP wurde in einer Konzentration von 0,3 mM zum Medium hinzugefügt.

Tabelle 1: Verwendete Stämme und ihre Eigenschaften.

Stamm	Beschreibung	Resistenz/ Auxo- trophie	Referenz/zur Verfügung gestellt von
Wildtypen			
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 (JG 7)	Wildtyp	Keine	(Venkateswar an <i>et al.</i> , 1999)
<i>E. coli</i> DH5αZI (JG 22)	<i>aci^q</i> , <i>PN25-tetR</i> , <i>Sp^R</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$, <i>Phi80 lacZΔM15</i>	Keine	(Lutz and Bujard, 1997)
<i>E. coli</i> WM3064 (JG 98)	<i>thrB1004</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> , <i>hsdS</i> , <i>lacZ,ΔM15</i> , <i>RP4-1360</i> , $\Delta(araBAD)567$, $\Delta dapA1341::[erm pir]$	DAP	W. Metcalf, Univ. of Illinois, Urbana
<i>Geobacter sulfurreducens</i> (JG 407)	Wildtyp	Keine	DSMZ

Stamm	Beschreibung	Resistenz/ Auxo- trophie	Referenz/zur Verfügung gestellt von
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (DSM 20481 (JG 1057)	Wildtyp	keine	DSMZ
Prophagen			
JG 918	<i>S. oneidensis</i> Deletion von SO_2939 und SO_3013	Keine	(Bursac, 2015)
JG 993	JG 98 pMQ150-Plasmid mit 500 Überhang zu SO_0641 und 500 Überhang zu SO_0685, dazwischen eine Spel-Schnittstelle		Diese Arbeit
JG 994	JG 98 pMQ150-Plasmid mit 500 Überhang zu SO_2652 und 500 Überhang zu SO_2704, dazwischen eine Spel-Schnittstelle		Diese Arbeit
JG 995	<i>S. oneidensis</i> Δ SO_2939 bis SO_3013, Δ SO_0641 bis SO_0685		Diese Arbeit
JG 996	<i>S. oneidensis</i> Δ SO_2939 bis SO_3013, Δ SO_0641 bis SO_0685, Δ SO_2652 bis SO_2704		Diese Arbeit
Acetoin			
JG 905	<i>S. oneidensis</i> MR-1 mit pBAD-Plasmid mit Acetoingenen (<i>alsSD</i>)	Km	(Bursac, 2015)
JG 992	JG 918 mit pBAD- <i>alsSD</i>	Km	(Bursac, 2015)
JG 919	<i>S. oneidensis</i> <i>araC-araP-alsSD</i> in SO_2939 und SO_3013	Keine	(Bursac, 2015)

Stamm	Beschreibung	Resistenz/ Auxo- trophie	Referenz/zur Verfügung gestellt von
Butandiol			
JG 1037	JG 919 mit pBAD- <i>budC</i>	Km	Diese Arbeit
JG 998	JG 918 mit pBAD- <i>budC-alsSD</i>	Km	Diese Arbeit
Acetat			
JG 711	<i>E.coli</i> WM 3064 mit pMQ150-500 Überhang zu <i>ackA</i> und 500 Überhang zu <i>pta</i> , dazwischen eine Spel-Schnittstelle	Km/DAP	Diese Arbeit
JG 1045	<i>E.coli</i> WM 3064 mit pMQ150-500 Überhang zu <i>ackA</i> und 500 Überhang zu <i>pta</i> , dazwischen <i>araP-budC</i>	Km/DAP	Diese Arbeit
JG 1038	JG 918 Δ <i>ackA/pta</i>	Km	Diese Arbeit
JG 1039	JG 1038 mit pBAD- <i>alsSD</i>	Km	Diese Arbeit
JG 1040	JG 919 Δ <i>ackA/pta</i>	Keine	Diese Arbeit
JG 1046	JG 919 Δ <i>ackA/pta::araP-budC</i>	Keine	Diese Arbeit
JG 1049	JG 1040 mit pBAD- <i>budC</i>	Km	Diese Arbeit
JG 1113	JG 1038 mit pBAD- <i>budC-alsSD</i>	Km	Diese Arbeit
Glycerin			
	<i>E. coli</i> DH5 α mit pUC- <i>mgsA-gpsA-hchA</i>	Amp	Diese Arbeit
	<i>E. coli</i> DH5 α mit pBAD- <i>mgsA-gpsA-hchA</i>	Km	Diese Arbeit
	<i>S. oneidensis</i> mit pBAD- <i>mgsA-gpsA-hchA</i>	Km	Diese Arbeit
	<i>E. coli</i> DH5 α mit pBAD- <i>mgsA-gpsA-hchA-glpF</i>	Km	Diese Arbeit
	<i>S. oneidensis</i> mit pBAD- <i>mgsA-gpsA-hchA-glpF</i>	Km	Diese Arbeit

Stamm	Beschreibung	Resistenz/ Auxo- trophie	Referenz/zur Verfügung gestellt von
	<i>E. coli</i> DH5α mit pBAD- <i>mgsA-gpsA-hchA-glpF-glpK</i>	Km	Diese Arbeit
	<i>S. oneidensis</i> mit pBAD- <i>mgsA-gpsA-hchA-glpF-glpK</i>	Km	Diese Arbeit
	JG 919 mit pBAD- <i>mgsA-gpsA-hchA-glpF-glpK</i>	Km	Diese Arbeit
	JG 1040 mit pBAD- <i>mgsA-gpsA-hchA-glpF-glpK</i>	Km	Diese Arbeit
Cellulose			
JG 1015	<i>S. oneidensis</i> MR-1 pBAD_cs [cs = celstrep Cellulase]	Km	(Dietrich, 2015)
JG 1016	<i>S. oneidensis</i> pBAD_φ(cs- <i>mtrF</i> _{löslich}) [cs = celstrep Cellulase; φ = Genfusion; N-terminal an <i>mtrF</i> _{löslich} , über starren Spacer verknüpft]	Km	(Dietrich, 2015)
JG 1018	<i>S. oneidensis</i> pBAD_φ(cs- <i>mtrF</i> _{löslich} ΔAS22-182) [cs = cel _{strep} Cellulase; φ = Genfusion; N-terminal an <i>mtrF</i> _{löslich} , über starren Spacer verknüpft]	Km	(Dietrich, 2015)
	<i>S. oneidensis</i> MR-1 Glucose adaptiert (Glu _{adapt})	PBS-Minimalmedium (MM) mit Glucose	Diese Arbeit
	<i>E. coli</i> DH5α mit pBAD- <i>celA</i>	Km	Diese Arbeit
	<i>S. oneidensis</i> (Glu _{adapt}) mit pBAD- <i>celA</i>	PBS-MM mit Glucose; Km	Diese Arbeit

Die Anzucht der Stämme erfolgte in der Regel in einer aeroben Vorkultur in LB. Die Kulturen wurden dann in das jeweilige Medium überführt.

3.2 Plasmide

Sämtliche Plasmide dieser Arbeit sind in Tabelle 2 gelistet. Die Plasmide dienten entweder als Vektor zum Einbringen von Genen in die Zellen oder zum Einbringen von Genen in das Genom von Bakterien.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide dieser Arbeit, sie dienten als Rückgrat oder als Transformationsvektor für Gene, ebenso dienten sie als Helferplasmide.

Plasmidbezeichnung	Informationen	Resistenz	Verweis
pBAD202	araC-araP (Restriktionsverdau mit NcoI und PmeI)	Km ^R	JG 574
pBAD-alsSD	Expression der Gene für die Acetolaktat-Synthase (<i>alsS</i>) und Acetolaktat-Decarboxylase (<i>alsD</i>) aus <i>B. subtilis</i> unter Arabinoseinduktion	Km ^R	(Bursac, 2015)
pMAL2e_budC	Diente als Ursprung für das Gen für die Butandiol-Dehydrogenase (<i>budC</i>) aus <i>K. pneumoniae</i>	Amp ^R	(Peschke, 2014) JG 834
pBAD-budC-alsSD	Expression von <i>alsSD</i> und <i>budC</i> unter Arabinoseinduktion	Km ^R	Sebastian Beblawy
pBAD-budC	Expression von <i>budC</i> unter Arabinoseinduktion	Km ^R	Diese Arbeit
pBAD-ceIA	Expression des Gens für die β -1,4-Glycosidase	Km ^R	Diese Arbeit

Plasmidbezeichnung	Informationen	Resistenz	Verweis
	(Cellobiase) aus <i>L. lactis</i> DSM 20481 unter Arabinoseinduktion		
pBAD-φ(cs- mtrF_{löslich}ΔAS22-182)	Expression des Gens für eine Cellulase (aus <i>Streptomyces</i> spec.) gekoppelt an ein lösliches, verkürztes MtrF ermöglicht Transport aus der Zelle unter Arabinoseinduktion	Km ^R	(Dietrich, 2015)
pUC-mgsA-gpsA- hchA	Expression der Gene für einen Glycerin- Stoffwechselabbauweg unter Arabinoseinduktion. Methylglyoxalsynthase (<i>mgsA</i>), Glycerin-3- Phosphat-Dehydrogenase (<i>gpsA</i>), Glyoxalase III (<i>hchA</i>) aus <i>E. coli</i>	Amp ^R	GenScript
pBAD-mgsA-gpsA- hchA	Expression der Gene für einen Glycerin- Stoffwechselweg unter Arabinoseinduktion. Methylglyoxalsynthase, Glycerin-3-Phosphat- Dehydrogenase, Glyoxalase III aus <i>E. coli</i>	Km ^R	Diese Arbeit
pBAD-mgsA-gpsA- hchA-glpF	Expression der Gene für einen Glycerin- Stoffwechselweg unter	Km ^R	Diese Arbeit

Plasmidbezeichnung	Informationen	Resistenz	Verweis
	Arabinoseinduktion. Gene für Methylglyoxalsynthase, Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, Glyoxalase III und Glycerin-Transporter (<i>glpF</i>) aus <i>E. coli</i>		
pBAD-<i>mgsA-gpsA-hchA-glpF-glpK</i>	Expression der Gene für einen Glycerin-Stoffwechselweg unter Arabinoseinduktion. Gene für Methylglyoxalsynthase, Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, Glyoxalase III, Glycerin-Transporter (<i>glpF</i>) aus <i>E. coli</i> , Glycerinkinase (<i>glpK</i>) aus <i>S. oneidensis</i>	Km ^R	Diese Arbeit
pMQ150	lacP, lacZa, <i>rpsL</i> , <i>sacB</i> , Km ^R ,	Km ^R	(Shanks <i>et al.</i> , 2009)
pMQ150-500up-MuSo1-500down	500 Überhang zu SO_641 und 500 Überhang zu SO_685, dazwischen Spel-Schnittstelle für die Deletion des Phagen	Km ^R	Diese Arbeit
pMQ150-500up-MuSo2-500down	500 Überhang zu SO_2651 und 500 Überhang zu SO_2704, dazwischen Spel-Schnittstelle für die Deletion des Phagen	Km ^R	Diese Arbeit

Plasmidbezeichnung	Informationen	Resistenz	Verweis
pMQ150-500up-Acetat-500down	500 Überhang zu <i>ackA</i> und 500 Überhang zu <i>pta</i> , dazwischen Spel-Schnittstelle für die Deletion der Gene für AckA und Pta	Km ^R	Diese Arbeit
pMQ150-500up-<i>budC</i> in <i>ackA/pta</i>-500down	500 Überhang zu <i>ackA</i> und 500 Überhang zu <i>pta</i> , dazwischen <i>araP-budC</i> für die Integration des Gens für die Butandiol-Dehydrogenase in <i>ackA/pta</i> -Lokus	Km ^R	Diese Arbeit

3.3 Primer

In dieser Arbeit verwendete Primer sind in Tabelle 3 gelistet.

Tabelle 3: Primer dieser Arbeit.

	Nr.	Listen-nummer	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
Deletion MuSo1	1	2115	SO_641_OL _pMQ_for	GTCACGACGTTGTA AAACGACGGCCAG TGCCAAGCTTGCAT GCCTGCAGGGCAA TCTCTCGCGTTGGA TG	MuSO1 in pMQ150
	2	2116	SO_641_rev	TTCTCATATAGGCG GCGTGC	MuSO1 in pMQ150
	3	2117	SO_685_OL _500 up_Spel_for	CGTGCATTCATAAT TAGCCGCACGCCG CCTATATGAGAAAC TAGTATAGACCTCT TAATTTATTGACC	MuSO1 in pMQ150

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
	4	2118	SO_685_OL _pMQ_revers e	GGAAACAGCTATGA CCATGATTACGAAT TCGAGCTCGGTAC CCGGGGATCCTCT ATCTACAGGCCAAT TA	MuSO1 in pMQ150
	5	2187	SO_641_ genomisch_t est_for	GGCGATTTTATTAA CCTCAAC	Test auf genomische Integration
	6	2188	SO_685_ genomisch_t est_rev	GTAAAATGTAAGTT TCTCCATC	Test auf genomische Integration
Deletion MuSo2	7	2109	SO_2651_O L_pMQ_for	GTCACGACGTTGTA AAACGACGGCCAG TGCCAAGCTTGCAT GCCTGCAGGTCGA TAGTCTACAACCTCA GA	MuSO2 in pMQ150
	8	2110	SO_2651_re verse	CTCAGCCCCGCTC TACGCC	MuSO2 in pMQ150
	9	2111	SO_2704_50 0up_ Spel_for	GGATCGAAGTGTT GATGAGAACTAGG CGTAGAGCGGGGC TGAGACTAGTAATC AGACTATTATTTTG AGC	MuSO2 in pMQ150
	10	2112	SO_2704_O L_pMQ_reve rse	GGAAACAGCTATGA CCATGATTACGAAT TCGAGCTCGGTAC CCGGGGATCGATC CCATTTATCTGCCT GA	MuSO2 in pMQ150

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
	11	2185	SO_2651_ genomisch_t est_for	GTTCCGGACAGGAA GAAAATCG	Test auf genomische Integration
	12	2186	SO_2704_ genomisch_t est_rev	GAAGCTGCGCCTC CAAAAG	Test auf genomische Integration
Acetat	13	2345	500_ack_OL _pMQ_for	CACGACGTTGTAAA ACGACGGCCAGTG CCAAGCTTGCATGC CTGCAGGGCCCAG GGATTGGCAATGTA TG	Deletion <i>pta/ack</i>
	14	2346	500_ack_rev	GTTTAAACCTTTTG CCATTGTG	Deletion <i>pta/ack</i>
	15	2347	ack_OL_Spel _500_for	CATGAATTCTGAATC ATTA ACTTAAACAC AATGGCAAAGGTT TAAACACTAGTATT AAACTAACAACACG CAAGC	Deletion <i>pta/ack</i>
	16	2348	500_pta_OL_ pMQ150_rev	CAGCTATGACCATG ATTACGAATTCGAG CTCGGTACCCGGG GATCAACAAAAACA GTAATGAAAGAAAA AAT	Deletion <i>pta/ack</i>
	17	2349	Primer_ack_t est_ genom_for	GATGAGCGCCATAT CAAGG	genomische Integration überprüfen
	18	2350	Primer_pta_t est_ genom_rev	CACGGGTTGTGTG TTGGC	genomische Integration überprüfen

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
Butan- diol	19	2113	BudC_OL_p BAD_for	GGGCTAGAAATAAT TTTGTTTAACTTTAA GAAGGAGATATACA TACCATGAAAAAGG TCGCACTTGTTAC	<i>budC</i> in pBAD solo
	20	2114	BudC_OL_p BAD_rev	GGCTGAAAATCTTC TTCATCCGCCAAA ACAGCCAAGCTGG AGACCGTTTTTGTAGT TAAATACCATCCCG C	<i>budC</i> in pBAD solo
	21	2342	araP_ackA_f or	CCATGAATTCGAAT CATTAACTTAAACA CAATGGCAAAGGT TTAAACACTGACGC TTTTTATCGCAAC	<i>budC</i> in <i>ackA/pta-</i> Lokus
	22	2344	BudC_OL_pt a_rev	CCTGTCAGTGCTTT TAGGCTGGGCTTG CGTGTTGTTAGTTT AATACTAGTTAGTT AAATACCATCCCGC C	<i>budC</i> in <i>ackA/pta-</i> Lokus
Glycerin	23		Gibson_MuS O2_Gly_for	GGGCTAGAAATAAT TTTGTTTAACTTTAA GAAGGAGATATACA TACC- GTAAACGGGATCG AAGTGTTG	Klonierung in pBAD aus pUC- Original
	24		Gibson_MuS O2_Gly_rev	GGCTGAAAATCTTC TTCATCCGCCAAA ACAGCCAAGCTGG AGACCGTTT-	Klonierung in pBAD aus pUC- Original

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
				CTATTATTTTGAGC AATATATCTTTG	
	25		pBAD_mgsA _for	GGGCTAGAAATAAT TTTGTTTAACTTTAA GAAGGAGATATACA TACCATGGAATTAA CTACTCGTACTT	Klonierung in pBAD ohne <i>fccA</i> Promoter
	26		glpF_intergati on_pBAD_for	GGTCGTGCTCGTA AAGATGAACGTTCT TCTCACTAATTCAA CAGGAGAGCATTAT GAGTCAAACATCAA CCTTG	Klonierung in pBAD
	27		glpF_intergati on_pBAD_re v	CTATTATTTTGAGC AATATATCTTTGCT CAAATAATAGTCT GATTACTAGTTACA GCGAAGCTTTTTGT TC	Klonierung in pBAD
	28		glpF_glpK_fo r	CAACTCCTTCAGAA CAAAAAGCTTCGCT GTAATTCAACAGGA GAGCATTATGCAAA AGAAATATGTGGTG	Klonierung von <i>glpK</i> in pBAD-Gly mit RBS
	29		glpK_pBAD_r ev	GAGCAATATATCTT TGCTCAAATAATA GTCTGATTACTAGT TAAGAACGGGTTCT TGCTAC	Klonierung von <i>glpK</i> in pBAD-Gly mit RBS
Glycerin- qPCR	30		mgsA_qPCR _for	GTCTTGGGTTGAAC GTCACC	Überprüfung der Gene für den

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
					Glycerin- stoffwechsel weg
	31		mgsA_qPCR _rev	CCAACCTTGTTGATC ACCACCC	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
	32		glpF_qPCR_f or	TACCGCTATTCTGA TGGGGC	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
	33		glpF_qPCR_r ev	AGACCAATCAGCAA GGGAGC	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
	34		glpK_qPCR_f or	TATTGTCAGCGTCT CCCAGC	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
	35		glpK_qPCR_ rev	CAGCACTGAACTTT GGCTCG	Überprüfung der Gene für den Glycerin-

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
					stoffwechsel weg
	36		hchA_qPCR_ for	GGTCACGGTGCTTT AATCGG	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
	37		hchA_qPCR_ rev	CTAAGAAAGCAGCT GGACCG	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
	38		gpsA_qPCR_ for	GGTGCTGGTATGT CTGATGG	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
	39		gpsA_qPCR_ rev	GGATCAGCACCTAA AGCAGC	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
	40		rpoA_qPCR_ for	GAAGCTATCCGTC GTTCTGC	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
	41		rpoA_qPCR_ rev	GACAGGACGCAAC AGAATCG	Überprüfung der Gene für den Glycerin- stoffwechsel weg
Cellu- lose	42		cel_OL_pBA D_ptcB_for	GGGCTAGAAATAAT TTTGTTTAACTTTAA GAAGGAGATATACA TACCGAATAAGGAG AAATAATTATGGC	Cellobiose- Operon aus <i>Lactococcus</i> in pBAD
	43		cel_OL_pBA D_celA_rev	GGCTGAAAATCTTC TTCATCCGCCAAA ACAGCCAAGCTGG AGACCGTTTTTAAA GTTCTTCACCATT GTTG	Cellobiose- Operon aus <i>Lactococcus</i> in pBAD
	44		Primer_OL_p BAD_celA_fo r	GGGCTAGAAATAAT TTTGTTTAACTTTAA GAAGGAGATATACA TACC ATGACTTTAAAAAA AGACTTCCTC	celA aus <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> in pBAD
	45		ptcC_SpeI_O L_pBAD_rev	CTTCTCTCATCCGC CAAAACAGCCAAG CTGGAGACCGTTTA CTAGTTTATTCAGC AGCATTAATTTTCAG	Umklonieru ng in zwei Teilen
	46		OL_ptcC_ara P_celA	CTGAAACAGAAGCT GAAACAGAAGCTG AAATTAATGCTGCT GAATAAACTGACGC	Umklonieru ng in zwei Teilen

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
				TTTTTATCGCAACT C	
	47		yecA_test_re v	GAACTGGTTTCACG TTCATC	Sequenzier ung
	48		yecA_test_fo r	CACATTAGTCTTCA CGAGTG	Sequenzier ung
	49		celA-test_for	GATGAGCTCAAGAA TTCTTG	Sequenzier ung
	50		ptcC_test_for	GATTCAAACCTCCAT TACAACAC	Sequenzier ung
qPCR- Zellzahl (Dolch <i>et al.</i> , 2014)	51	751	S.o. SYBR GREEN for	TATTCAAGTGCTTC TATTAG	qPCR- Quantifizier ung der Zellen auf der Anode
	52	752	S.o. SYBR GREEN rev	AAGAACTTCTACTC AACA	qPCR- Quantifizier ung der Zellen auf der Anode
Test- Primer	53	1194	pBAD_test_f or	GATTAGCGGATCCT ACCTGAC	Plasmid- Sequenzier ung
	54	1195	pBAD_test_r ev	CTCTCATCCGCCAA AACAGC	Plasmid- Sequenzier ung
	55	41	pMQ150_test _for	CTGGCGAAAGGGG GATGTG	Plasmid- Sequenzier ung

	Nr.	Listen- nummer	Be- zeichnung	Sequenz 5' → 3'	Beschreib- ung
	56	42	pMQ150 – test_rev	CATTAGGCACCCCA GGCTTTAC	Plasmid- Sequenzier- ung

Die Primer wurden in einer Konzentration von 2 µM für PCRs und 4 µM für qPCRs mit DNase freiem Wasser angesetzt und anschließend bei -20°C aufbewahrt. Für die Sequenzierung erfolgte die Durchführung nach den Herstellerangaben.

3.4 Medien

Alle Medien wurden vor Verwendung autoklaviert. Waren einzelne Bestandteile wie z.B. Saccharose, Glucose oder Arabinose nicht autoklavierbar, wurden diese steril filtriert (2 µm, Millipore; Darmstadt) und nachträglich hinzugegeben. Medien für anaerobe Kultivierungen (*Shewanella oneidensis*) wurden durch zyklisches Begasen mit N₂ und Vakuum ziehen der Sauerstoff entzogen. Das *Geobacter*-Medium wurde mit N₂/CO₂-Gas (80%/20%) vor dem Autoklavieren begast.

3.4.1 Lysogeny-Broth-Medium (LB)

Für aerobe Vorkulturen wurde LB-Medium in unterschiedlichen Volumina verwendet. Hierbei wurden sowohl Reagenzgläser als auch Erlenmeyerkolben genutzt.

Tabelle 4: Komponenten für das LB-Medium.

Komponente	Menge in g/l
Trypton	10
NaCl	5
Hefeextrakt	5

Für die Anzucht von *Lactococcus lactis* DSM 20481 (JG 1057) wurde dem LB-Medium 20 mM Glucose nach dem Autoklavieren zugegeben.

3.4.2 Medien zur Anzucht von *Shewanella oneidensis*

Für die Anzucht von *S. oneidensis* wurde zunächst über Nacht eine aerobe Vorkultur in LB (Kapitel 3.4.1) angezogen und diese in das anaerobe M4-Medium oder PBS –

Medium überimpft. Hierfür wurde zunächst ein 10-fach Konzentrat (Tabelle 5) hergestellt.

3.4.2.1 M4-Medium

Das M4-Medium wurde zu Beginn der Arbeit verwendet, da es in der Arbeitsgruppe schon etabliert war.

Tabelle 5: 10-fach Salze für M4-Medium für die Aufzucht von *S. oneidensis*.

Komponenten	Menge/l
K₂HPO₄	2,21 g
KH₂PO₄	0,99 g
HEPES	14,065 g
NaHCO₃	1,68 g
NH₄SO₄	11,89 g
NaCl	87,7 g

Für die Anzucht von *S. oneidensis* unter anaeroben Bedingungen wurde das M4-Medium mit Laktat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor. Fumarat wurde hierbei zunächst in 500 ml ddH₂O unter Zugabe von 6 g NaOH gelöst. Bei Erreichen eines pH-Wertes von 6,5 wurden die restlichen Komponenten hinzugeben und der endgültige pH auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 6: M4-Medium mit Fumarat und Laktat als Elektronenakzeptor und -donor.

Komponenten	Menge/l
10-fach M4-Salze	100 ml
Spurenelemente (100x)	10 ml
MgSO₄ (1 M)	1 ml
CaCl₂ (0,1 M)	1 ml
Na-D,L-Laktat (50%)	11,4 g (50 mM)
Fumarsäure	11,6 g (100 mM)
Caseinhydrolysat	1 g

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und das Medium in Aliquots anaerobisiert.

Auf Basis des M4-Mediums wurden ebenfalls Cokultivierungen mit dem homofermentativen *Lactococcus lactis* durchgeführt. Hierbei wurde die

Carboxymethylcellulose (CMC) zunächst unter Erwärmen gelöst und dann alle weiteren Komponenten zugegeben.

Tabelle 7: Medium für die Co-Kultivierung mit *Lactococcus lactis*

Cokultur-Medium	Menge/l
10-fach M4-Salze	100 ml
Spurenelemente (100x)	10 ml
MgSO₄ (1 M)	1 ml
CaCl₂ (0,1 M)	1 ml
Fumarsäure	11,6 g (100 mM)
Yeast extract	1 g
Trypton	0,5 g
Laktat (50%)	1,12 g (5 mM)
CMC (0,5%)	5 g

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und das Medium in Aliquots anaerobisiert.

3.4.2.2 PBS-Medium

In weiteren Versuchen wurde das PBS-Medium eingeführt um eine Vergleichbarkeit mit den Kooperationspartnern im Projekt zu erreichen.

Hierzu wurden ebenfalls zunächst 10x-Salze angesetzt.

Tabelle 8: 10x Salze für das PBS-Medium.

Komponente	Menge/l
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na₂HPO₄	14,4 g
KH₂PO₄	2,4 g

Im Weiteren wurden je nach Anwendung unterschiedliche Medien daraus hergestellt.

Tabelle 9: *Shewanella*-Spurenelemente (100x).

Komponente	Menge/l
Na ₂ EDTA	2,5 g
MnSO ₄ * H ₂ O	22 mg
NaCl	58,4 mg
Fe(II)Cl ₂ *4 H ₂ O	107,4 mg
CoCl ₂	64,9 mg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	28,8 mg
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	5,0 mg
H ₃ BO ₃	350 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	94,4 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	118,9 mg
Na ₂ SeO ₄ * 6 H ₂ O	39,5 mg

Die Spurenelemente wurden autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 10: PBS-Medium ohne Elektronendonator und –akzeptor für die Anwendung als aerobes Wachstumsmedium oder Waschpuffer für Zellen.

Komponente	Menge/l
PBS-Salzlösung (10x)	100 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,18 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O 1 M stock	1 ml
CaCl ₂ 1000x 0,1 M stock	1 ml
<i>Shewanella</i> -Spurenelemente 100x	10 ml
Caseinhydrolysat	1 g

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Tabelle 11: PBS-Medium mit 0,01% Casaminsäuren ohne Elektronendonator und –akzeptor für die Anwendung als aerobes Wachstumsmedium.

Komponente	Menge/l
PBS-Salzlösung (10x)	100 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,18 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O 1 M stock	1 ml
CaCl ₂ 1000x 0,1 M stock	1 ml
<i>Shewanella</i> -Spurenelemente 100x	10 ml
Caseinhydrolysat	0,1 g

Tabelle 12: Medium für anaerobe Wachstumskurven. Als Elektronendonoren wurden Laktat (10 mM), Glycerin (10 oder 20 mM), Cellobiose (10 mM) oder Glucose (20 mM) genutzt. Als Elektronenakzeptoren Fumarat (20 oder 40 mM) oder DMSO (20 oder 40 mM).

Komponente	
PBS-Salzlösung (10x)	100 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,18 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O 1 M stock	1 ml
CaCl ₂ 1000x 0,1 M stock	1 ml
<i>Shewanella</i> -Spurenelemente 100x	10 ml
Caseinhydrolysat	0,1 g
Elektronendonor	
Elektronenakzeptor	

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und das Medium anschließend anaerobisiert.

3.4.3 Medium für die Anzucht von *Geobacter sulfurreducens*

Für die Anzucht des anaeroben Bakteriums *Geobacter sulfurreducens* wurde das folgende Medium verwendet, welches in der Arbeitsgruppe bereits etabliert ist.

Tabelle 13: 10x Salze für das *Geobacter*-Medium.

Komponente	Menge/l
KH ₂ PO ₄	4,2 g
K ₂ HPO ₄	2,2 g
NH ₄ Cl	2,0 g
KCl	3,8 g
NaCl	3,6 g

Die 10x-Salze werden für das Anzuchtmedium und das Anodenmedium benötigt. Außerdem wurden die allgemeinen Spurenelemente verwendet (Tabelle 14).

Tabelle 14 Zusammensetzung der NB-Spurenelemente.

Komponente	Menge/l
Nitrilotriessigsäure (mit KOH auf 6,5)	2,14 g
MnCl₂ * 4 H₂O	0,1 g
FeSO₄ * 7 H₂O	0,3 g
CoCl₂ * 6 H₂O	0,17 g
ZnSO₄ * 7 H₂O	0,2 g
CuCl₂ * 2 H₂O	0,3 g
AlK(SO₄)₂ * 12 H₂O	0,005 g
H₃BO₃	0,005
Na₂MoO₄ * 2 H₂O	0,11 g
NiSO₄ * 6 H₂O	0,11 g
Na₂WO₄ * 2 H₂O	0,2 g

Der pH wurde auf 7,0 eingestellt.

Tabelle 15: Geobacter-Anzuchtmedium mit Acetat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor.

Komponente	Menge/l
Geobacter-Salzlösung (10x)	100 ml
NaHCO₃	1,8 g
Na₂CO₃	0,5 g
MgCl₂ * 6 H₂O (1M Lösung)	1 ml
Fumarat	4,64 g
NaAcetat	1,24 g
NB-Spurenelemente (100x)	10 ml
Selenit-Wolframat	1 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt und das Medium anaerobisiert. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium wie folgt komplementiert.

Tabelle 16: Komplementation der autoklavierten Medien.

Komponente	Menge/l
Vitaminlösung (100x)	10 ml
10% Hefeextrakt (D26w/v)	10 ml
0,5 M Cystein	2 ml
200 mM Na-Ascorbat	1 ml
0,4 M CaCl ₂ +2H ₂ O	1 ml
Casitone	10 ml

Das komplementierte Medium wurde entweder umgehend verwendet oder im Kühlschrank bis zum Gebrauch aufbewahrt.

3.4.3.1 Komplementationslösungen

Die Komplementationslösungen wurden separat hergestellt, sterilisiert und anaerobisiert.

3.4.3.1.1 Vitaminlösung für *Geobacter*-Medium

Tabelle 17: Vitaminlösung für *Geobacter*-Medien (auch unter DSMZ Medium 141)

Komponente	Menge/l
Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin-HCl	10,0 mg
Thiamin-HCl	5,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
DL-CaPantothenat	5,0 mg
Nicotinsäure	5,0 mg
Vitamin B12	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure	5,0 mg
Liponsäure	5,0 mg

Der angesetzte Liter wird anschließend in eine anaerobe Flasche steril filtriert und mit N₂ anaerobisiert. Die Vitaminlösung wird im Dunkeln und bei 4°C aufbewahrt.

3.4.3.1.2 200 mM Na-Ascorbat

Für 50 ml einer 200mM Na-Ascorbat-Lösung werden 1,98 g in ddH₂O lösen, der pH wird mit NaOH auf 7 eingestellt. Anschließend wird die Lösung anaerobisiert und autoklaviert.

3.4.3.1.3 0,5 M Cystein

Für ein Volumen von 50 ml 0,5 M Cystein werden 3,03 g unter Zugabe von 3 M NaOH gelöst und ein pH von 5 eingestellt. Die Cystein-Lösung wird anschließend steril filtriert, anaerobisiert und bei 4°C aufbewahrt.

3.4.3.1.4 10% Hefeextrakt

Für eine 10%ige Hefeextrakt-Lösung werden 10g Hefeextrakt in 100 ml ddH₂O gelöst, anaerobisiert und autoklaviert.

3.4.3.1.5 Selenit-Wolframat

Tabelle 18: Selenit-Wolframat-Komplementationslösung.

Komponente	Menge/l
NaOH	0,5 g
Na ₂ SeO ₃	3 mg
Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	4 mg

3.4.3.1.6 20% Casitone

20 g Casaminosäuren wurden in 100 ml ddH₂O gelöst, anaerobisiert und steril filtriert. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

3.4.3.1.7 0,4 M Calciumchlorid-Lösung

2,94 g CaCl₂+2H₂O wurden in 50 ml ddH₂O gelöst, anaerobisiert und autoklaviert.

Nach dem Autoklavieren wurden die *Geobacter*-Medien komplementiert und anschließend beimpft. Das komplementierte Medium wurde bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.4.4 Medien für bioelektrochemische Zellen

Je nach Ansatz wurden folgende Medien für die bioelektrochemischen Zellen verwendet. Die Anodenmedien wurden anaerobisiert und anschließend autoklaviert.

Das Kathodenmedium bzw. der Waschpuffer wurde in 250 ml Aliquots autoklaviert. Als Induktor diente Arabinose welcher vor dem Inokulieren zum Anodenmedium gegeben wurde. Auch Antibiotika wurden vor dem Inokulieren dem Anodenmedium zugesetzt.

3.4.4.1 M4-Medien

Tabelle 19: Anodenmedium für die bioelektrochemischen Zellen mit *S. oneidensis*.

Komponente	Menge/l
10-fach Salze für M4-Medium	100 ml
MgSO₄ (1 M)	1 ml
CaCl₂ (0,1 M)	1 ml
Laktat (50%)	11,2 g
Casaminosäuren	1 g

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 20: Kathodenmedium für die bioelektrochemischen Zellen mit *S. oneidensis*.

Komponente	Menge/l
10-fach Salze für M4-Medium	100 ml
MgSO₄ (1 M)	1 ml
CaCl₂ (0,1 M)	1 ml
<i>Shewanella</i>-Spurenelemente (100x)	10 ml
Casaminosäuren	1 g

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

3.4.4.2 PBS-Medien

Tabelle 21: Anodenmedium für BEC-Experimente mit Laktat als Elektronendonator.

Komponente	Menge/l
PBS-Salzlösung (10x)	100 ml
(NH₄)₂SO₄	1,18 g
MgSO₄ * 7 H₂O 1 M stock	1 ml
CaCl₂ 1000x 0,1 M stock	1 ml
<i>Shewanella</i>-Spurenelemente (100x)	10 ml
Caseinhydrolysat	1 g
Laktat (60%)	1,87 g

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 22: Waschpuffer für BEC-Experimente.

Komponente	Menge/l
PBS-Salzlösung (10x)	100 ml
(NH₄)₂SO₄	1,18 g
MgSO₄ * 7 H₂O 1 M stock	1 ml
CaCl₂ 1000x 0,1 M stock	1 ml
<i>Shewanella</i>-Spurenelemente (100x)	10 ml
Caseinhydrolysat	1 g

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt und in 250 ml Aliquots unterteilt.

3.4.4.3 Cokulturmedien

Tabelle 23: Cokulturmedium für Brennstoffzellen-Experimente mit *Geobacter* (Acetat 5 mM) und *Shewanella* (Laktat 10 mM).

Komponente	Menge/l
<i>Geobacter</i>-Salzlösung (10x)	100 ml
NaHCO₃	1,8 g
Na₂CO₃	0,5 g
MgCl₂ * 6 H₂O 1M Lösung)	1 ml
NaAcetat	0,413 g
Laktat (60%)	1,87 g
Spurenelemente grün	10 ml
Selenit-Wolframat	1 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

Tabelle 24: Komplementation des Cokultur-Anodenmediums.

Komponente	Menge/l
Vitaminlösung	10 ml
10% Hefeextrakt (D26w/v) (Endkonz. 0,1%)	10 ml
0,5 M Cystein (Endkonz. 1 mM)	2 ml
200 mM Na-Ascorbat (Endkonz. 0,2 mM)	1 ml
0,4 M CaCl₂+2 H₂O (0,4 mM)	1 ml
Casitone (Endkonz. 2%)	10 ml

3.5 Molekularbiologische Methoden

Für die Integration verschiedener Gene in *Escherichia coli* und *Shewanella oneidensis* wurden folgende Methoden angewandt.

3.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction* (PCR)) dient der Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten. Hierbei ergänzen hitzestabile Polymerasen aus thermophilen Organismen wie *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) oder *Pyrococcus furiosus* (Pfu-Polymerase) die DNA-Stränge komplementär und vervielfältigen die gewünschten DNA-Abschnitte. Diese Amplifikate können dann zum einen für weitere Klonierungen eingesetzt werden. Eine PCR kann aber auch zum Überprüfen von erfolgreichen Klonierungen dienen. Hierbei werden für jede gefragte Sequenz ein spezifisches Primerpaar benutzt. Ein Primerpaar besteht immer aus einem *forward*- und einem *reverse*-Primer. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 3 gelistet.

Als Thermocycler für diverse Reaktionen diente der S1000 der Firma BioRad (München). Es wurde zum einen die Taq-Polymerase im Mango-Mix (Bioline, Lückenwalde) für die PCR genutzt und zum anderen eine veränderte Pfu-Polymerase, die HiFi-Polymerase (PCR Biosystems Ltd, London). In Tabelle 25 ist das Reaktionsgemisch für einen Ansatz mit dem Mango-Mix aufgeführt. Die Mango-PCR-Reaktion wurde so gewählt, dass das Amplikon kleiner als 4 kb war. Eine sogenannte Kolonie-PCR wurde durchgeführt um eine Klonierung oder Transformation zu überprüfen.

Tabelle 25: Reaktionsgemisch für einen PCR-Ansatz.

Komponente	Menge
Mango-Mix (2x)	7,5 µl
Primer forward (2 µM)	3,25 µl
Primer reverse (2 µM)	3,25 µl
Template DNA (0,1 - 0,5 µg/ml) oder Material einer Kolonie	1 µl

In Tabelle 26 ist das PCR-Programm für eine Mango-PCR eingetragen.

Tabelle 26: PCR-Programm für eine Mango-PCR, Schritt 2-4 wurden 28-35x wiederholt.

Schritt	Temperatur	Zeit in Minuten
1 Denaturierung	95°C	0,5
2 Denaturierung	95°C	0,5
3 Anlagerung der Primer	Spezifische Primer-Temperatur (50-65°C)	0,5
4 Elongation	72°C	0,5 je 1 kb
5 Finale Elongation	72°C	10
6	12°C	∞

Im Falle einer Kolonie-PCR wurde die Initialtemperatur auf 5 Minuten erhöht um einen Zellaufschluss zu erreichen.

Die Mango-Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion, darum wurde für Sequenzierungen und Amplifikate für weitere Klonierungen die Hifi-Polymerase gewählt. Auch für Kolonie-PCR mit einem Produkt größer als 4 kb wurde die Hifi-Polymerase verwendet.

Tabelle 27: Reaktionsgemisch für eine Hifi-PCR mit 50 µl Volumen.

Komponente	Menge
Hifi-Puffer	10 µl
Primer forward (2 µM)	10 µl
Primer reverse (2 µM)	10 µl
DMSO (bei Bedarf)	1,5 µl
Template oder Kolonie	1 µl
Hifi-Polymerase	0,5 µl
Nukleasefreies Wasser	X µl bis 50 µl Gesamtvolumen

Im Falle einer Hifi-Reaktion wurde folgendes Programm gewählt.

Tabelle 28: PCR-Programm für eine Hifi-PCR, Schritt 2-4 wurden 28-35x wiederholt.

Schritt	Temperatur	Zeit in Minuten
1 Denaturierung	95°C	2
2 Denaturierung	95°C	0,25
3 Anlagerung der Primer	Spezifische Primer-Temperatur (zwischen 55 und 65°C)	0,25
4 Elongation	72°C	0,5 je 1 kb
5 Finale Elongation	72°C	10
6	12°C	∞

Jedes PCR-Produkt wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen um die Produktgröße zu überprüfen.

3.5.2 Isolation und Reinigung von DNA

Zur Aufreinigung von Plasmiden für weitere Klonierungsschritte wie Restriktionsverdau oder Transformationen wurde das folgende Protokoll durchgeführt.

3.5.2.1 Plasmid-Isolation

Es wurden 5 bis 25 ml LB mit dem plasmidtragenden Bakterium angeimpft, das erforderliche Antibiotikum zugegeben und über Nacht bei der optimalen Temperatur inkubiert. Am Folgetag wurde die gewachsene Kultur pelletiert (Eppendorf-Zentrifuge, Hamburg). Es wurden je nach Volumen Reagiergefäße zweimal mit 2 ml Übernachtskultur abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Anschließend erfolgte die Plasmid-Isolation nach Protokoll des *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System*- Kit der Firma Promega (Mannheim). Von jeder Säule wurde das Plasmid mit 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Die Konzentration wurde durch den NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt und anschließend wurde das Plasmid bei -20°C aufbewahrt. Für weitere Klonierungen wurden die Plasmide mittels Restriktionsenzymen geschnitten.

3.5.2.1.1 Restriktionsverdau

Je nach Plasmid wurden die entsprechenden Restriktionsenzyme eingesetzt. Die Enzyme wurden nach Hersteller-Angaben (NEB, Ipswich, MA, USA) inkubiert.

Tabelle 29: Ansatz eines Restriktionsverdau in einem Volumen von 50 μl .

Komponente	Menge
Plasmid	2 μg
Je Enzym (NEB)	1 μl
CutSmart Puffer (NEB) (10x)	5 μl
Wasser	Auf 50 μl

Die Inkubation erfolgte in der Regel bei 37°C und je nach Enzym für 15-120 Minuten. Der Verdau wurde durch eine elektrophoretische Auftrennung via Agarose-Gel gestoppt. Hierbei wurde immer das unverdaute Plasmid als Kontrolle mit aufgetragen. Das geschnittene Plasmid wurde dann aus dem Gel aufgereinigt.

3.5.2.1.2 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung erfolgte mit CIP (NEB, Ipswich, MA, USA), Calf Intestinal Phosphatase. Die Dephosphorylierung war notwendig bei einem Restriktionsverdau mit nur einem Enzym um eine spätere Religation des Plasmids zu vermeiden. CIP konnte in den Restriktionsverdau als zweites Enzym gegeben werden und dephosphorylierte während des Verdau.

3.5.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA mit Agarose-Gelen

Für die Kontrolle von DNA wurde eine elektrophoretische Auftrennung durch Agarose-Gele gewählt. Hierbei trennen sich DNA-Fragmente der Größe nach auf. Diese Fragmente können dann für weitere Analysen oder Klonierungen aus dem Gel aufgereinigt werden.

In der Regel wurden 1%ige Agarose-Gele (w/v) für die Auftrennung verwendet. Hierzu wurde Agarose in 1x TAE-Puffer (Tabelle 30) aufgekocht und gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde je 10 Milliliter Agarose-Lösung 1 μl Midori Green (1:5 verdünnt) (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) hinzugegeben. Da Midori Green in DNA interkaliert kann es mittels UV-Licht detektiert werden. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen. Der Kamm wurde nach dem Aushärten entfernt. Das Gel wurde in eine Laufkammer gelegt und mit 1x TAE (Tabelle 30) übergossen. Nun konnten die Vertiefungen mit den Proben beladen werden.

Tabelle 30: 1x TAE-Puffer für Agarose-Gele und als Laufmittel in der Kammer.

Komponente	Menge
Tris	4,85 g
EDTA	0,37 g

Der pH wurde mit Acetat auf 8 eingestellt.

Jedes Gel wurde zusätzlich mit einem 1 kb-Marker der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) beladen. Dieser diente der Identifizierung der DNA-Länge nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau.

3.5.4 Aufreinigung von PCR-Produkten bzw. DNA aus einem Agarose-Gel

Die Aufreinigung von sämtlicher DNA über ein Agarose-Gel erfolgte über das *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*-Kit der Firma Promega (Mannheim).

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in ein DNasefreies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das weitere Prozedere wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde mit 50 µl nukleasefreiem ddH₂O und einem Inkubationsschritt von einer Minute bei 60°C von der Säule eluiert. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration via NanoDrop wurde die DNA bei -20°C aufbewahrt.

3.5.5 Klonierung mittels isothermaler Ligation

Um ein Zielgen in einen geeigneten Vektor zu klonieren wurde dieses via PCR amplifiziert. Als Klonierungsmethode diente die isothermale Ligation nach Gibson (Gibson *et al.*, 2009).

Hierzu wurden die Gene mit einem 50 Basenpaarüberhang zum linearisierten Zielvektor amplifiziert. Die Gene wurden aus einem Agarose-Gel mit dem Promega *Wizard PCR and Gel purification Kit* (Mannheim) aufgereinigt. Die Konzentrationen der DNA-Fragmente wurde anschließend mittels NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen.

Die isothermale Ligation nach Gibson *et al.*, 2009 verbindet Reaktionen von drei Enzymen in einem Ansatz. Zunächst schneidet eine T5-Exonuklease an den 5'-Enden und erzeugt dadurch sogenannte *sticky ends* (engl.). Die entstandenen einzelsträngigen Bereiche am 3'-Ende können nun zu ihren jeweilig homologen

Bereichen komplementär binden. Eine korrekturlese Polymerase, wie Hifi oder *iProof* füllt diese Stellen wieder zu Doppelsträngen auf. Eine Tag-DNA-Ligase verknüpft die einzelnen DNA-Fragmente letztlich miteinander. Die zu verknüpfenden DNA-Moleküle wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt. Die 1,5 stündige Reaktion fand bei 50°C im PCR-Cycler (C1000 oder S1000 Thermo Cycler, BioRad, München) statt.

Tabelle 31: Zusammensetzung für 250 µl des isothermalen 5x Reaktionspuffers.

Komponente	Menge
Tris/HCl, pH 7,5 (1 M)	125 µl
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (1 M)	12,5 µl
dNTPs (10 mM)	25 µl
DTT (1 M)	12,5 µl
NAD ⁺ (100 mM)	12,5 µl
Polyethylenglycol 8 kDa Feststoff	62,5 mg
H ₂ O	62,5 µl

Die Reaktionsansätze (Tabelle 32) wurden in 15 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur Anwendung bei -20°C gelagert

Tabelle 32: Isothermaler Ligationsansatz für 24 Aliquots zu je 15 µl.

Komponente	Spezifische Enzymaktivität	Menge
Reaktionspuffer (5x)		80 µl
Hifi-Polymerase	2 U/µl	5 µl
Taq-DNA-Ligase	40 U/µl	40 µl
T5-Exonuclease	0,1 U/µl	16 µl
H ₂ O		239 µl

Für einen Ansatz wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt und die DNA-Fragmente (Tabelle 33) hinzugegeben.

Tabelle 33: Reaktionsansatz einer isothermalen Ligation. Das Gesamtvolumen umfasst 20 µl. Es sollten maximal 100 ng Gesamt-DNA eingesetzt werden.

Komponente	Menge
Ligationsansatz	15 µl
Linearisierter Vektor	1-4 µl
Insert	1-4 µl

Die Reaktion findet bei 50°C für 1,5 Stunden im Thermocycler statt.

Anschließend an die Ligation wurde der Ansatz für die Elektroporation dialysiert. Dafür wurden 10 bis 20 µl des Ansatzes auf eine Millipore-Membran (Darmstadt) mit einer Porengröße von 0,25 µm aufgetragen. Diese wurde zuvor auf DNase-freiem Wasser in einer sterilen Petrischale gelegt. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach vorsichtig in die Elektroporationsküvetten zu den vorbereiteten Zellen gegeben.

3.5.6 Herstellen von Deletionsvektoren

Für die Deletion der Phagen MuSo1 und 2 wurde wie in Tabelle 34 angegeben, die Fragmente erstellt und via Gibson in einen mit BamHI und Sall geschnittenen pMQ150-Vektor kloniert.

Tabelle 34: Primer und Fragmentgröße der *up*- und *down*-Fragmente für die Deletion der weiteren Phagen.

Fragment	Primer	Größe (kb)
MuSo1 up	Nr. 1/2 (Listennummer: 2115/2116)	0,5
MuSo1 down	Nr. 3/4	0,5
Fusionsprodukt mit Spel-Schnittstelle	Nr. 1/4	1
MuSo2 up	Nr. 7/8 (Listennummer: 2109/2110)	0,5
MuSo 2 down	Nr. 9/10 (Listennummer: 2111/2112)	0,5
Fusionsprodukt mit Spel-Schnittstelle	Nr.7/10	1

In der Mitte ist eine Spel-Schnittstelle für spätere Integrationen. Die Deletion wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Für MuSo1 mit den Primern Nr. 5 und 6 (Listennummer: 2187/2188). Für MuSo2 mit den genomisch bindenden Primern Nr. 11 und 12 (Listennummer: 2185/2186).

3.5.7 Herstellen von Vektoren für die Integration der Produktionsgene

Das pBAD-*budC*-Plasmid wurde kloniert, indem zunächst der pBAD-Vektor mit NcoI und PmeI enzymatisch geschnitten wurde. Das Gen *budC* wurde aus dem Vektor pMAL-*budC* (JG 834) mittels der Primer Nr. 19 und 20 amplifiziert. Hierbei wurden

Überhänge zum leeren pBAD-Plasmid hergestellt für eine Gibson-Ligation. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α wurden die Klone via Kolonie-PCR mit den Testprimern Nr. 51 und 52 (Listennummer: 1194/1195) getestet. Positive Klone wurden für eine Plasmidextraktion angesetzt und anschließend sequenziert. Die richtig-sequenzierten Plasmide wurden in *S. oneidensis* via Elektroporation eingebracht. Anschließend wurden mittels Kolonie-PCR die Klone getestet und die positiven sequenziert.

3.5.8 Deletion der Acetatsynthese-Gene und Integration von *budC*

Für die Deletion von *ackA* und *pta* wurde zunächst ein pMQ150-Vektor mit 500 up und down-Fragmenten erstellt. Mit den Primern Nr. 13 und 14 (Listenprimer 2345/2346) und den Primern Nr. 15 und 16 wurden die Fragmente zu dem zu deletierenden Genlokus amplifiziert. Diese 500 bp-Fragmente wurden mittels Gelaufreinigung und anschließender Fusions-PCR mit den Primern Nr. 13 und 16 zu einem 1 kb-Fragment zusammengesetzt. Die Transformation des Gibson-Ansatzes erfolgte mittels Elektroporation in einen *E. coli* WM 3064-Stamm. Das 1 kb-Fragment besitzt in der Mitte eine *SpeI*-Schnittstelle für die Integration von weiteren Genen in diesen Lokus. Nach der Konjugation und der folgenden Selektion wurden die Klone mittels der Testprimer Nr. 17 und 18 (Listennummer: 2349/2350) getestet. Hierbei ist die Wildtyp-Bande 4,5 kb und die Bande der Mutante 1 kb groß.

Für die Integration von *budC* in diesen Lokus wurde das isolierte pMQ150-500up_ *ackA*-*SpeI*-500down_ *pta*-Plasmid mit *SpeI* enzymatisch verdaut und dephosphoryliert. Das Gen *budC* wurde mit den Primer Nr. 21 und 22 (Listennummer: 2342/2344) mit Überhängen zu den up-down-Fragmenten amplifiziert und via Gibson-Ligation in den Vektor kloniert. Nach einer positiven Kolonie-PCR wurde der entsprechende WM3064 Stamm für eine Mating mit *Shewanella* eingesetzt. Die Kontrolle erfolgte mittels der Testprimer Nr. 17 und 18. Der leere Lokus war hierbei 1 kb und mit integriertem *budC* mit Ara-Promoter 1,941 kb.

3.6 Transformationsmethoden

Mit Hilfe einer Transformation wird DNA in den Zielorganismus eingebracht. Zum einen wurde in dieser Arbeit mittels Elektroporation Zellen transformiert und zum anderen via Konjugation zwischen *E. coli* WM3064 und *S. oneidensis*-Stämmen ein gezielter Austausch von Plasmiden erreicht. Für eine Elektroporation müssen zunächst kompetente Zellen hergestellt werden.

3.6.1 Elektroporation

Zur Transformation von Bakterien werden kompetente Zellen benötigt, die in der Lage sind DNA aufzunehmen.

Um kompetente Zellen für die Elektroporation herzustellen, wurde ein Klon eines Bakterienstamms in 5 ml LB oder SOB über Nacht angezogen.

Tabelle 35: Zusammensetzung des SOB-Mediums zur Anzucht elektrokompetenter Zellen.

Komponente	Menge in g/l
Trypton	20
Hefeextrakt	5
NaCl	0,58
KCl	0,19

Am nächsten Morgen wurden 1% der Kultur in 25 ml überimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 schüttelnd bei optimaler Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 30 Minuten auf Eis gestellt um den Zellstoffwechsel zu verlangsamen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 6000 g und bei einer Temperatur von 4°C pelletiert. Die Zellen wurden viermal mit eiskaltem, sterilem ddH₂O gewaschen. Letztlich wurden die Zellen 10-fach mit sterilem Wasser aufkonzentriert. Die Zellen wurden umgehend zur Transformation eingesetzt. Für einen Transformationsansatz wurden 100 µl Zellen benötigt.

Die Elektroporation erzeugt mittels Stromimpuls Poren in der Bakterienmembran, durch welche die DNA vom Bakterium aufgenommen werden kann. Für die Elektroporation wurden Plasmide oder Ligationsansätze verwendet. 2-10 µl der DNA wurden mit 100 µl elektrokompetenter Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes (*E. coli*-Pulser, BioRad, München) mit 1,8 kV für 4,0-5,8 ms gepulst, die Zeit variiert je nach Elektrolytfreiheit des Ansatzes. Direkt nach der Elektroporation werden die Zellen in SOC-Medium (Tabelle 36) aufgenommen und für mehrere Stunden bei 30 oder 37°C inkubiert.

Tabelle 36: Zusammensetzung des SOC-Mediums zur Regeneration der elektrotransformierten Zellen.

Komponente	Menge in ml/50ml
SOB	47,2
MgCl ₂ (1M)	1
Glucose (10%)	1,8

Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht inkubiert. In der Regel wurde der restliche Ansatz am nächsten Tag pelletiert und erneut ausplattiert.

3.6.2 Konjugation

Für eine genomische Integration von Genen in *S. oneidensis* wurde ein DAP-auxotropher *E. coli*-Stamm WM3064 als Donorstamm genutzt. Für die genomische Modifikation wurde der Suizidvektor pMQ150 verwendet. Das pMQ150-Plasmid trägt eine Kanamycin-Resistenz, ein Gen für die Levansucrase und einen sogenannten λ-pir-Ori. Diese Eigenschaften ermöglichen zum einen auf Kolonien die das Plasmid in das Genom integriert haben zu selektieren und zusätzlich das Plasmid durch Saccharosedruck wieder zu entfernen. Für die Deletion von Genen wurden *upstream* und *downstream* des zu entfernenden Bereichs 500 bp amplifiziert und mit einer Schnittstelle in der Mitte fusioniert. Anschließend wurden die jeweiligen 1 kb Fragmente in den mit BamHI und Sall linearisierten pMQ150-Vektor via Gibson-Reaktion ligiert.

Für die Deletion von Genen folgte nun die Konjugation der entsprechenden *E. coli*- und *Shewanella*-Stämme. Hierzu wurden die beiden Stämme gemeinsam auf einer DAP-LB-Platte ausgestrichen und bei 30°C über Nacht inkubiert. Alle Inkubationsschritte werden bei 30°C durchgeführt. Am folgenden Tag wurden möglichst viele Zellen auf eine LB-Platte mit Kanamycin und ohne DAP ausgestrichen. Hiermit erreicht man nur das Wachstum von *Shewanella*-Kolonien mit integrierten Plasmid. Von dieser Platte wurden zwei Einzelklone auf eine frische Kanamycin-Platte ausgestrichen. Von den gewachsenen Einzelklonen wurden wiederum einzelne Klone in 5 ml LB über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen ausplattiert. Hierzu wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:100 auf 5%-Saccharose-Platten ausplattiert und über zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Saccharose kann nur von Zellen verstoffwechselt werden

die das Plasmid noch im Genom tragen. Dies führt zu einem schleimartigen Mantel um die Zellen und die Zellen gehen zugrunde. Dieser Druck führt zum Entfernen des Plasmids aus dem Genom und soll dabei die gewünschten Modifikationen erzeugen. Um dies zu testen wurden via Kolonie-PCR auf die spezifischen Bereiche getestet und überprüft, ob die Bereiche dem Wildtyp oder der Mutante entsprechen.

3.7 Realtime PCR und quantitative PCR

Mithilfe der Realtime-PCR können die Transkriptionsraten von Genen verglichen werden und eine Aussage über die Expressionsrate von Genen getroffen werden.

3.7.1 Realtime-PCR

3.7.1.1 Isolation von RNA

Die Isolierung von RNA aus Zellproben erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers mit dem Qiagen *RNeasy MiniKit*. Hierfür wurden die Triplikate einer Wachstumskurve zusammengenommen und gemeinsam isoliert. Es wurde in 50 µl eluiert und die Konzentration und Reinheit via NanoDrop bestimmt. Anschließend folgte um eine Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen eine gelelektrophoretische Auftrennung. Bei dieser Methode sollten zwei klare Banden für die rRNA zu sehen sein und dazwischen die mRNA. Banden die höher laufen sind Verunreinigungen durch genomische DNA, dann folgte ein DNase-Verdau.

3.7.1.2 DNase-Verdau

Mit Hilfe des Invitrogen™ DNA-free™ DNA Removal Kit (Thermofisher) wurde laut den Herstellerangaben die DNA verdaut und die RNA-Menge anschließend via NanoDrop gemessen. Nach einem erneuten Kontrollgel wurde die RNA für die cDNA eingesetzt.

3.7.1.3 Umschreiben von RNA in cDNA

Durch das *iScript™ Select cDNA Synthesis* Kit von (BioRad) wurde die RNA in cDNA mit Random Primern umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend in der Realtime-PCR eingesetzt.

Tabelle 37: Ansatz für eine cDNA-Transkription-Reaktion.

Komponente	Menge/Ansatz
RNA (50 ng/μl)	1 μl
Puffer (10x)	2 μl
Reverse Transkriptase	1 μl
Wasser	16 μl

Die verbleibende cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.7.1.4 Realtime-PCR-Protokoll

Für die Realtime PCR wurden genspezifische Primer bestellt um die Gene von Interesse nachweisen zu können. Hierbei wurde darauf geachtet das die PCR-Produkte möglichst gleich groß (ca. 100 bp) sind. Zusätzlich wurde als Haushaltsgen eine RNA-Polymerase (RpoA) gewählt.

Tabelle 38: Ansatz für eine Realtime-Reaktion.

Komponente	Menge
SYBR Green SSadvanced	10 μl
Primer (4 μM)	4 μl
Primer (4μM)	4 μl
cDNA	2 μl

Laut Protokoll wird der Einsatz von 2 μl cDNA empfohlen.

Die PCR wurde im Realtime-Cycler (BioRad) durchgeführt. Die Primer waren so konzipiert, dass sie bei 60°C binden.

Tabelle 39: Protokoll der Realtime-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Denaturierung	95°C	7 min
2 Denaturierung	95°C	10 s
3 Anlagerung der Primer	Spezifische Primer-Temperatur (60°C)	15 s
4 Elongation	65°C	30 s, dann Fluoreszenzmessung
5 Finale Elongation	65°C bis 98°C	Messung der Fluoreszenz alle 5 s mit Anstieg der Temperatur um 0,5°C bis 95°C
6	12°C	∞

Nach Schritt 4 wurde die Fluoreszenz gemessen. Im Falle der Realtime-PCR konnte mittels des Haushaltsgens die Expression bestimmt werden. Hierzu wurden die C_q-Werte in ein Verhältnis gesetzt und die Werte des Haushaltsgen als 100% angenommen.

3.7.2 Quantitative PCR

Für die qPCR dienten Anoden und Medium als Probenmaterial.

3.7.2.1 DNA-Isolation für qPCR

Für die quantitative PCR wurde DNA von unterschiedlichen Proben isoliert. Diese Methode wurde genutzt zur Bestimmung von Zellzahlen auf Anoden oder im Medium. Für die Quantifizierung wurde zunächst eine Eichgerade erstellt hierfür wurden *Shewanella*-Wildtyp Zellen über Nacht angezogen. Die Kultur wurde in 1:10 und 1:100 Verdünnungen mittels Neubauer-Kammer ausgezählt und anschließend in Triplikaten die DNA isoliert. Hierfür wurde unverdünnt, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000 gewählt. Für die DNA-Isolation wurde das InnuPrep-Kit von AnalytikJena (Jena, Deutschland) verwendet. Es wurde laut den Herstellerangaben durchgeführt. Eine Abwandlung gab es bei der DNA-Isolation der Anoden. Diese wurden nach dem Beenden des Laufs bei -20°C in einem Falcon aufbewahrt. Für die DNA-Isolation wurden die Anoden mit einem Skalpell zerkleinert und 5 ml SLS in das Falcon gegeben. Nach 1 Minute vortexen wurden die Falcons 15 Minuten bei 95°C im

Wasserbad erhitzt. Dann wurden zweimal 1 ml der Lösung entnommen und in Reagiergefäße überführt. Diese wurden für 2 Minuten bei 8.000g in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, da noch Anodenmaterial mit in Lösung waren. Es wurden 650 µl entnommen und nach Herstellerangaben weiter verfahren. Die DNA wurde bei 4°C aufbewahrt bis zur Anwendung in der qPCR.

3.7.2.2 qPCR-Protokoll

Die qPCR wurde wie folgt je Probe angesetzt.

Tabelle 40: Ansatz für eine qPCR-Reaktion.

Komponente	Menge
SYBR Green SSadvanced	10 µl
Primer <i>Shewanella</i> qPCR for (4 µM)	4,5 µl
Primer <i>Shewanella</i> qPCR rev (4µM)	4,5 µl
DNA-Probe	1 µl

Die PCR wurde im Realtime-Cycler (BioRad) durchgeführt. Die Primer waren so konzipiert, dass sie bei 59°C binden. Die Schritte 2 bis 4 wurden 34 mal durchgeführt.

Tabelle 41: Protokoll der qPCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Denaturierung	95°C	7 min
2 Denaturierung	95°C	10 s
3 Anlagerung der Primer	Spezifische Primer-Temperatur (59°C)	15 s
4 Elongation	65°C	30 s dann Fluoreszenzmessung
5 Finale Elongation	65°C bis 98°C	Messung der Fluoreszenz alle 5 s mit Anstieg der Temperatur um 0,5°C bis 95°C
6	12°C	∞

Nach Schritt 4 wurde die Fluoreszenz gemessen. Bei der quantitativen PCR wurden die Zellzahlen durch die Eichgerade ermittelt.

3.8 Analytik

Für eine Auswertung der verwendeten Substrate und daraus entstandenen Produkte wurden diverse Methoden angewendet.

3.8.1 HPLC

Mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (*high performance liquid chromatography* (HPLC)) können in Flüssigkeiten Stoffen identifiziert werden. Zur Analyse wurde eine Aminex HPX-87H-Säule (BioRad, München) benutzt, welche die organischen Säuren, wie Acetat, Laktat oder Formiat über Größe und Ladung trennt und mit einer Hitachi Elite La Chrom-Anlage konnektiert ist (VWR, Darmstadt). Als Detektor diente der Diode Array Detector (DAD) L-2455. Die Messung erfolgte in diesem Fall im UV-Bereich bei 210 nm. In dieser Arbeit wurden die Analysen hauptsächlich mittels RI-Detektor (RefraktoMax520) durchgeführt, da dieser in der Lage ist auch Stoffe wie Butandiol, Glycerin und diverse Zucker darzustellen. Die entstehenden Peaks werden mit Standards verglichen und so die Konzentration bestimmt.

Für die Analysen wurden die Proben zuvor 2 Minuten bei 16 000 g abzentrifugiert und gefiltert (Spritzenvorsatzfilter PTFE 0,2 µm, VWR, Darmstadt). 150 µl Probe wurden mit 15 µl 0,5 M filtrierter Schwefelsäure versetzt und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Das Probenvolumen zur Analyse betrug 50 µl bei einer Flussrate von 600 µl/min und einer Ofentemperatur von 60°C. Als Laufmittel diente in diesem Fall 5 mM Schwefelsäure. Die Standards wurden gleichermaßen vorbereitet wie die Proben. Für eine Kalibrierung wurden sechs unterschiedliche Konzentrationen der erwarteten Substanzen gemessen.

3.8.2 Glycerin-Bestimmung

Da Glycerin in einigen Ansätzen mittels HPLC nicht nachgewiesen werden konnte, da Fumarat als Elektronenakzeptor die gleiche Retentionszeit besitzt wurde in diesen Fällen auf eine optische Methode zurückgegriffen.

Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol und kann durch die Free Glycerol Reagent (Sigma, St. Louis, USA) nachgewiesen werden. Glycerin wird in diesem Fall durch die Glycerinkinase (GK) phosphoryliert. Es entsteht Glycerin-1-Phosphat, welches als Substrat für die Glycerin-Phosphat-Oxidase (GPO) dient. Die Glycerin-Phosphat-Oxidase katalysiert die Reaktion von Glycerin-1-Phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Wasserstoffperoxid. Die Peroxidase katalysiert die Bindung von H₂O₂ mit 4-Aminoantipyrin und Natrium-N-ethyl-N-(3-Sulfopropyl) *m*-

Anisidin. Es folgt eine Violett-Färbung, welche auf Quinonimin zurück zu führen ist und bei 540 nm das Absorptionsmaximum besitzt (Sigma, n.d.).

Der Glycerin-Standard wurde von 0 bis 2,5 mM angesetzt und im Duplikat gemessen. Die Proben wurden verdünnt um im Detektionsbereich der Standardwerte zu liegen. In einer Mikrotiterplatte wurden 20 µl der Proben vorgelegt und mit 180 µl der Reaktionslösung versetzt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 540 nm gemessen.

3.8.3 Optische Dichte

Die Messung der optischen Dichte (OD_{600}) bei 600 nm diente der Bestimmung der Bakteriendichte im Medium. Hierfür wurden 1 ml der Probe in eine Küvette überführt und gegen eine Referenz gemessen. Es wurde das Gerät Genesys20 Spectronic der Firma Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) benutzt.

3.8.4 Acetoin-Bestimmung

Der Acetoin-Nachweis wird auch als Vogues-Proskauer-Test bezeichnet und wurde durch Barritt (1936) noch intensiviert. Hierbei werden auch die benötigten Reagenzien als Barritt A und B bezeichnet und könne zum Beispiel von der Firma Sigma als fertige Lösungen bezogen werden.

Acetoin wird mit Hilfe von Luftsauerstoff und 1-Naphthol zu Diacetyl oxidiert. Diacetyl bildet unter Anwesenheit von einer guanidinhaltigen Verbindung, wie L-Arginin, eine tiefpinke Farbe (Barritt, 1936). Für eine Quantifizierung wurde eine Kalibrierung von 0 bis 5 mM Acetoin eingesetzt. Es wurden 20 µl der Proben in einer Mikrotiter-Platte vorgelegt und 140 µl der Reaktionslösung dazu gegeben. Die Platte wurde für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 490 nm im Plattenlesegerät ausgelesen.

Tabelle 42: Acetoin-Nachweis für eine Mikrotiter-Platte.

Komponente	Menge/96-Well-Platte
ddH ₂ O	10 ml
L-Arginin (10 mg/ml in ddH ₂ O)	1,4 ml
1-Naphtol (50 mg/ml in Ethanol)	1 ml
KOH (40%)	1 ml

Hierbei ist die Einhaltung der Reihenfolge und das sorgsame Zumischen jeder Komponente wichtig, da die Lösung sonst trüb wird. Mit Zugabe von KOH wird die Reaktion gestartet.

3.9 Wachstumskurven und Zellsuspensionsassays

Das Wachstum der Stämme wurde mittels verschiedener Medien untersucht. Hierbei wurde am Vortag eine Übernachtskultur in LB mit den jeweiligen Zusätzen angesetzt. Vor der Inokulation das Wachstumsmedium wurde die OD bestimmt. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen und in das komplementierte Medium in definierten optischen Dichten überführt. Die Triplikate der Wachstumskurven wurden in der Regel mit einer OD von 0,05 und die der Zellsuspensionsassays (CSA) mit einer OD von 0,5 bis 1 angesetzt. Alle Proben wurden bei -20°C für weitere Analysen aufbewahrt.

3.10 Bioelektrochemische Zellen (BEZ)

Da *S. oneidensis* und *G. sulfurreducens* eine verlängerte Elektronentransportkette besitzen und so in der Lage sind Elektronen auf Elektronenakzeptoren außerhalb der Zelle zu übertragen, können sie in bioelektrochemischen Zellen angewendet werden. Diese Systeme bieten die Möglichkeit die Produktion von Stoffen, den Verbrauch von Substraten und die Stromproduktion zu überwachen. Vorteil dieser Systeme ist der nicht abnehmende Elektronenakzeptor, die Anode, bei einem konstanten Potential.

3.10.1 Aufbau der BEZ

Die in dieser Arbeit verwendeten bioelektrochemischen Zellen (BEZ) wurden wie in Abbildung 7 aufgebaut und anschließend mit 270 ml dH₂O befüllt und autoklaviert. Die BEZ besteht aus einer anoxischen Anodenkammer (250 - 270 ml) und zu Beginn dieser Arbeit einem oxischen Kompartiment, der Kathodenkammer (10 ml), welche über eine Protonen-permeable Membran (FumaPem F-950, EW 900 g/eq, Dicke: 50 µm) der Firma Fumatech (Bietigheim-Bissingen) voneinander getrennt sind. In späteren Versuchen wurde auf die Membran verzichtet. Im Gegenelektroden-Kompartiment war ein Platinnetz (0,5x1,5 cm) mit Platindrähten für eine Konnektierung eingebaut.

Das Anodenmaterial war zum einen ein Graphitvlies mit einer Fläche von 3,5 x 6 cm (SIGRATHERM; SGL Group, Wiesbaden). Das zunächst wasserabweisende Vlies

wurde mit Isopropanol getränkt und anschließend mehrfach in dH₂O gelegt. Dies diente dem Austausch von Isopropanol gegen Wasser. Als weiteres Material wurde elektrogewebenes Material verwendet, dies wurde von Johannes Erben (Arbeitsgruppe Sven Kerzenmacher, Bremen) zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde eine fensterartige Anodenhaltung verwendet und Titandraht zur Konnektierung. Die Vorbereitung des Anodenmaterials erfolgte gleichermaßen, wie für das Graphitvlies.

Es wurden Silber-Silberchlorid-Referenzelektroden (Ag/AgCl) (Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) eingesetzt. Ein Rührfisch diente dem kontinuierlichen Mischen des Anodenmediums. Als Magnetrührer diente das Modell Topolino der Firma VWR (Frankfurt) bei 300 rpm (niedrigste Stufe).

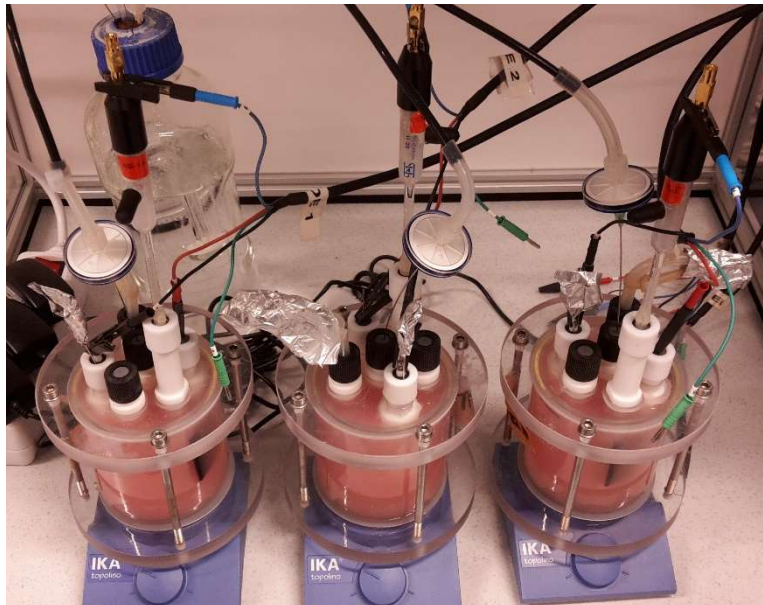


Abbildung 7: Bioelektrochemische Zellen (BEZ) mit einem Volumen von 270 ml. Die BEZ besitzen einen Port zur Probenentnahme und Begasung (mit Sterilfilter). Ebenso für den Einsatz im Dreielektrodensetup, einen Port für die Referenzelektrode, Anode und Gegenelektrode. Die MFCs wurden von Dr. F. Golitsch konstruiert.

Jeder BEC-Lauf wurde in Triplikaten angesetzt und kontinuierlich überwacht. Die Laufzeit betrug je nach Ansatz 48 bis 168 Stunden.

3.10.2 Vorbereitung der Bakterien

Zu Beginn der Arbeit wurden die Zellen aus einer aeroben LB-Übernachtskultur nach mehrmaligem Waschen in ein anaerobes M4-Fumarat-Laktat-Medium überführt. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit M4-Waschpuffer dreimal gewaschen bei 6000 g für 5 Minuten bei 4°C und anschließend in einer definierten OD in das Anodenmedium überführt. Nach der Deletion der Acetatkinase und Phosphotransacetylase wiesen die Zellen kein anaerobes Wachstum mehr auf. Darum

wurde auf eine aerobe LB-Vorkultur reduziert. Und diese nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer bei 6000 g für 5 Minuten bei 4°C in das Anodenmedium überführt. Wie oben bereits erwähnt wurde in dieser Arbeit zu Beginn M4 verwendet und nachfolgend PBS-Medium. *G. sulfurreducens* wurde im *Geobacter*-spezifischen Anzuchtmedium kultiviert und anschließend nach dreimaligem Waschen bei 6000 g für 5 Minuten bei 4°C mit Waschpuffer in das Cokulturmedium überführt.

Nach Beenden der BEC wurden 100 µl Anodenmedium auf LB-Platten ausplattiert um eine Kontamination auszuschließen und in einigen Fällen die Anode bei -20°C aufbewahrt.

4 Ergebnis

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Arbeit aufgeführt. Diese lassen sich in zwei Teile untergliedern. Zum einen in die Verbesserung der Elektrodenperformance und zum anderen in die damit einhergehenden molekularbiologischen Veränderungen des Stoffwechsels.

4.1 Elektrodenperformance

Um die Leistung von *Shewanella oneidensis* in den bioelektrochemischen Systemen zu verbessern, wurden folgende Modifikationen vorgenommen. Diese sind zum einen auf biologischer und zum anderen auf Seite des Elektrodenmaterials.

4.1.1 Biologische Modifikationen

Bereits in Vorarbeiten wurde der λ -Prophage aus dem Genom von *S. oneidensis* deletiert und dies führte zu erhöhten Stromdichten (Bursac, 2015). Dies wurde auf eine geringere Zelllyse unter Stressbedingungen zurückgeführt. Deshalb war es von Interesse, ob die Deletionen weiterer Prophagen zu einer weiteren Steigerung führen. Die Prophagen MuSo1 (SO0641 bis SO0685) und MuSo2 (SO2652 bis SO2704) wurden zusätzlich schrittweise deletiert. Die Deletion der Prophagen erfolgte mittels pMQ150- Vektor und den jeweiligen *up*- bzw. *downstream* Fragmenten (Tabelle 34).

In der Mitte ist eine Spel-Schnittstelle für spätere Integrationen. Die Deletion wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Für MuSo1 mit den Primern Nr. 5 und 6. Für MuSo2 mit den genomisch bindenden Primern Nr. 11 und 12.

So wurden eine Doppelmutante und eine Trippelmutante hergestellt und in BEC-Experimenten im Vergleich zur $\Delta\lambda$ -Mutante und Wildtyp getestet. Es wurde ein Potential von 0 mV gegen Normal-Wasserstoff-Elektrode (engl.: *Normal Hydrogen Electrode* (NHE)) angelegt und eine OD₆₀₀ von 0,13 als Start-OD. Über 48 Stunden wurde der Strom aufgezeichnet und anschließend die Anoden bei -20°C für die Zellzahlbestimmung mittels qPCR aufbewahrt.

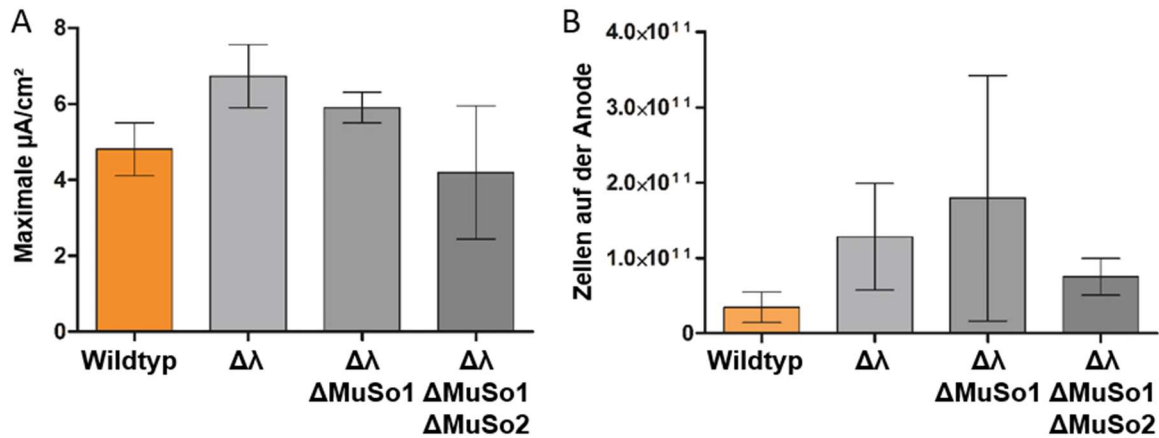


Abbildung 8: Gemittelte Daten der bioelektrochemischen Zellen mit einer OD_{600} von 0,13 und M4-Anodenmedium. Versuche wurden mit Membran (PEM) durchgeführt. A: Gemittelte maximale Stromstärke aus Triplikaten. B: Gemittelte Zellzahl aus isolierter DNA von den Anoden der Triplikate.

Im Vergleich zum Wildtyp ist eine 1,34fache Stromsteigerung durch die Deletion des λ -Phagen zu verzeichnen. Die Deletion der weiteren Prophagen führt zu keiner höheren Stromproduktion im Vergleich zur $\Delta\lambda$ -Mutante. Die Anzahl der lebenden Zellen auf der Anode ist im Vergleich bei der $\Delta\lambda$ -Mutante ebenfalls erhöht. Es ist mit der weiteren Deletion der Prophagen keine weitere Stromsteigerung zu erzielen. Daher wurden alle weiteren Versuche mit der $\Delta\lambda$ -Mutante durchgeführt.

4.1.2 Materialanpassungen

Um eine weitere Steigerung der Stromproduktion und damit auch Umsatzrate von Laktat zu erzielen, wurde in weiteren Experimenten das elektrogewebene Material von Johannes Erben (AG Kerzenmacher) in einzelnen Ansätzen getestet. Hierbei konnte in parallelen Ansätzen gezeigt werden, dass mit der $\Delta\lambda$ -Mutante eine Steigerung der Stromproduktion im Vergleich zum Graphitvlies um das 2,5fache erreicht werden kann (Edel, 2018). Dies lässt auf eine potentielle Steigerung der Umsetzung von Laktat zu gezielten Produkten erwarten. Im Weiteren werden die Stoffwechsellanpassungen beschrieben und ausgewertet. Die weiteren Ergebnisse der bioelektrischen Systeme sind in Kapitel 4.3 gesammelt aufgeführt.

4.2 Metabolic Engineering

S. oneidensis ist in der Lage Laktat unter anoxischen Bedingungen mit z. B. Fumarat als Elektronenakzeptor in Acetat, Formiat bzw. CO_2 und H_2 umzusetzen (Beblawy et

al., 2018b). Um *S. oneidensis* weitere Substrate zugänglich zu machen wurde das Bakterium genetisch modifiziert. Des Weiteren wurde die Herstellung weiterer Produkte ermöglicht und Acetat als unerwünschtes Nebenprodukt eliminiert.

4.2.1 Acetoin- und Butandiolproduktion

Die genomische Integration der Acetoinogene wurde ebenfalls bereits in Vorarbeiten in den λ -Lokus erreicht, wie auch das korrespondierende pBAD-Plasmid erstellt (Bursac, 2015).

In dieser Arbeit werden die Gene aus *B. subtilis* für die Acetoin synthese genutzt und die Butandiol-Dehydrogenase (BudC) aus *K. pneumoniae*. BudC wurde in Vorarbeiten für *E. coli* codonoptimiert und in einen pMAL-Vektor kloniert (JG 834) (Peschke, 2014). Ausgehend von diesem wurde die Butandiol-Dehydrogenase in pBAD kloniert und in die Stämme mit der genomischen Integration der Acetoinogene im λ -Lokus kloniert. Des Weiteren wurde ein pBAD-Plasmid mit allen drei Genen für die Butandiolsynthese (pBAD-*budC-alsSD*) verwendet. So konnte *S. oneidensis* mit Laktat als Substrat sowohl Acetoin, als auch Butandiol synthetisieren. Die Analyse erfolgte via HPLC oder mit Hilfe einer kolorimetrischen Messung via Voges-Proskauer-Reaktion.

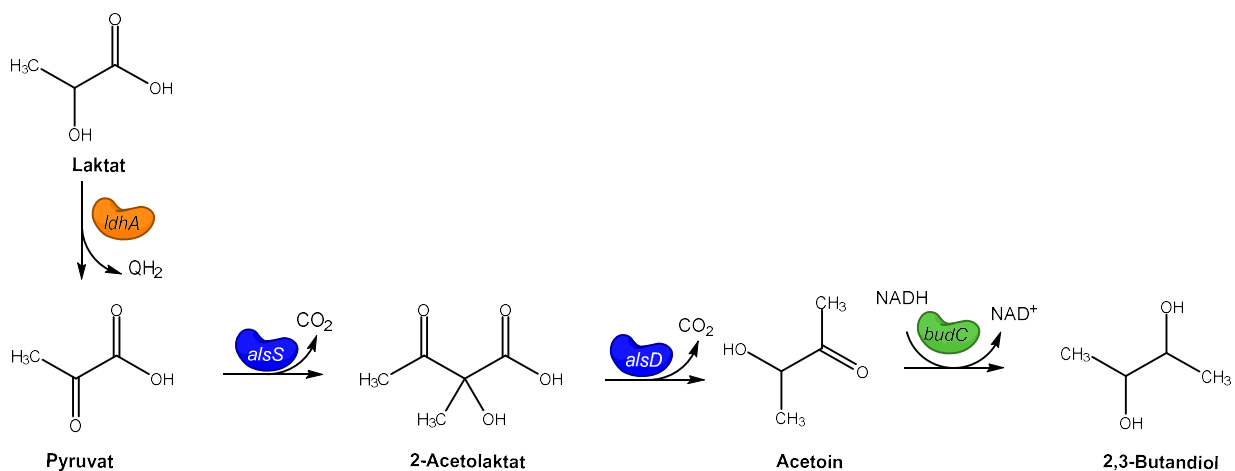


Abbildung 9: Synthese von Acetoin bzw. Butandiol. Aus zwei Mol des Intermediats Pyruvat werden 1 Mol Acetoin. Zur Synthese von Butandiol wird über die Oxidation von NADH Acetoin reduziert.

4.2.1.1 Zellsuspensionsassays mit Stämmen mit Acetatkinase und Phosphotransacetylase

Diese Stämme wurden in Wachstumskurven und Zellsuspensionsassays auf ihre Produktivität getestet. In Abbildung 10 sind die HPLC-Daten eines Zellsuspensionsassays dargestellt. Die Zellen wurden mit OD_{600} 1 in eine anoxisches

Laktat-Fumarat-PBS-Medium inokuliert. Zu den Kulturen mit Plasmid wurde 0,1 mM Arabinose und 50 µg/ml Kanamycin hinzugegeben. Die genomisch integrierten Gene wurden mit 5 mM Arabinose induziert.

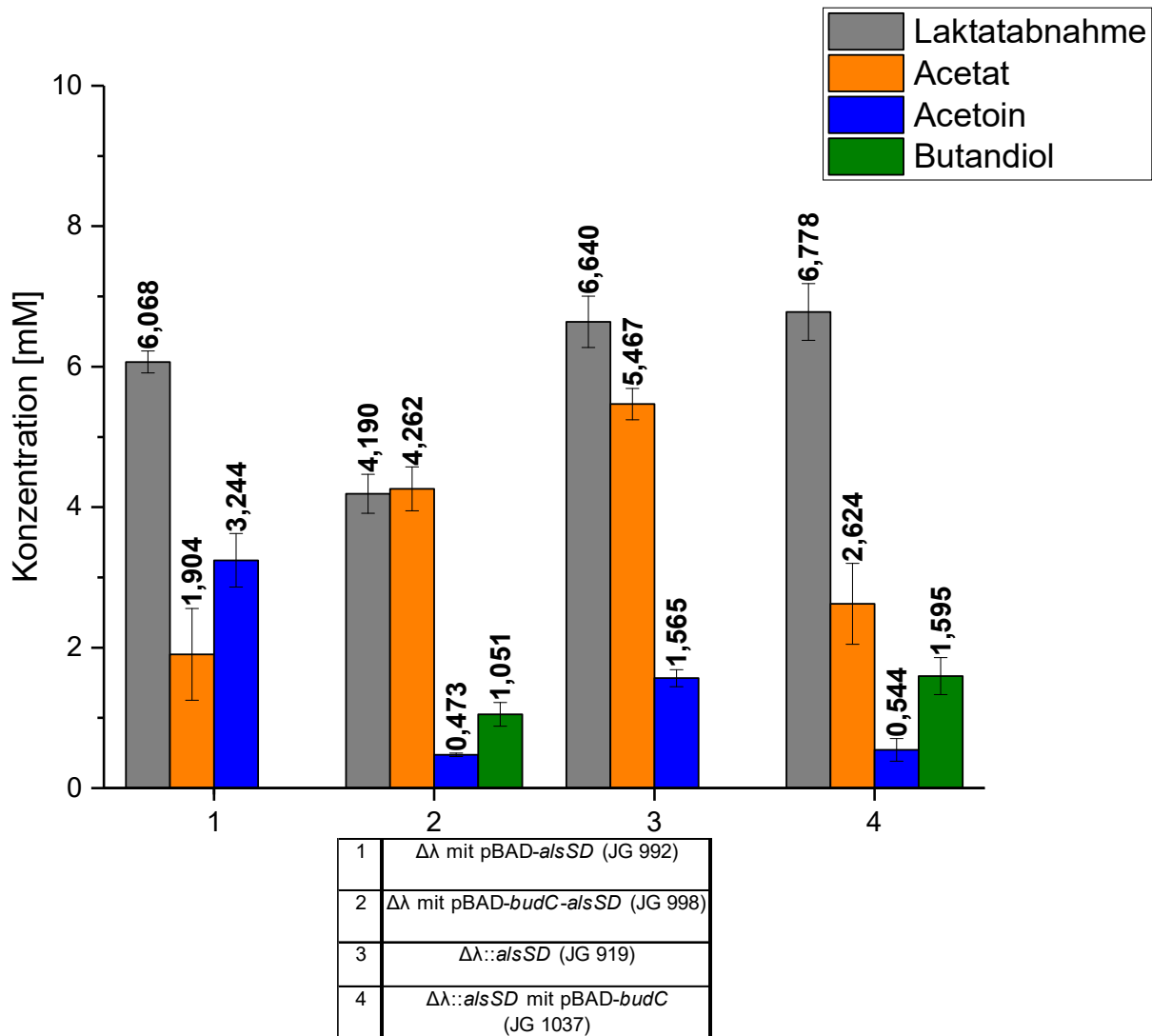


Abbildung 10: HPLC-Daten der Zellsuspensionsassays nach 4 Stunden des Experiments. Die Kulturen mit Plasmid wurden mit 0,1 mM Arabinose induziert und 50 µg/ml Kanamycin zum Erhalt des Plasmids hinzugegeben. Die genomisch integrierten Gene wurden mit 5 mM Arabinose induziert. Diese Stämme tragen keine Resistenz. Der Zellsuspensionsassay wurde mit 10 mM Laktat als Elektronendonator und 20 mM Fumarat als Elektronenakzeptor durchgeführt.

Stöchiometrisch können aus zwei Mol Laktat ein Mol Acetoin bzw. Butandiol gebildet werden. Aus einem Mol Laktat kann auch ein Mol Acetat gebildet werden. Der anaerobe Stoffwechsel von *S. oneidensis* gewinnt Energie aus der Bildung von Acetat.

In diesem Ansatz wurde nach vier Stunden von der Mutante $\Delta\lambda$ mit pBAD-*alsSD* (JG 992) aus 6,07 mM Laktat 1,9 mM Acetat und 3,24 mM Acetoin gebildet. Der Stamm der zusätzlich Butandiol synthetisieren kann, $\Delta\lambda$ mit pBAD-*budC-alsSD* (JG 998) konsumierte 4,19 mM Laktat und die Kulturen zeigten eine Acetatkonzentration

von 4,26 mM, eine Acetoinkonzentration von 0,473 mM und Butandiolkonzentration von 1,05 mM. Die genomische Integration der Acetoinogene, $\Delta\lambda::alsSD$ (JG 919), führte zu einer Produktion von 1,56 mM Acetoin und 5,47 mM Acetat aus 6,64 mM Laktat. Durch die Transformation des pBAD-*budC*-Plasmids in $\Delta\lambda::alsSD$ (JG 1037) konnte zusätzlich Butandiol gebildet werden. Somit wurden aus 6,78 mM Laktat 2,62 mM Acetat, 0,544 mM Acetoin und 1,59 mM Butandiol gebildet. Um die Produktivität zu erhöhen wurde die Bildung des Nebenprodukts Acetat durch die Deletion der Produktionsgene von *ackA* und *pta* verhindert.

4.2.1.2 Zellsuspensionsassays mit Stämmen ohne Acetatkinase und Phosphotransacetylase

Die Deletion der Gene für die Acetatkinase (*ackA*) und Phosphotransacetylase (*pta*) führte zu einem Verlust des anaeroben Wachstums auf Laktat und Fumarat. Dies wurde bereits von Hunt *et al.* (2010) beschrieben, da die Mutanten nicht mehr in der Lage sind ausreichend ATP zu synthetisieren (Hunt *et al.*, 2010). Darum wurden in dieser Arbeit mit diesen Mutanten keine anaeroben Wachstumskurven durchgeführt, sondern Zellsuspensionsassays (CSA). Diese wurden mit einer OD₆₀₀ von 1 in PBS-Medium mit 10 mM Laktat und 20 mM Fumarat angesetzt. Während kein anaerobes Wachstum zu verzeichnen war, wurde dennoch das Substrat in Zellsuspensionsassays zum gewünschten Produkt umgesetzt.

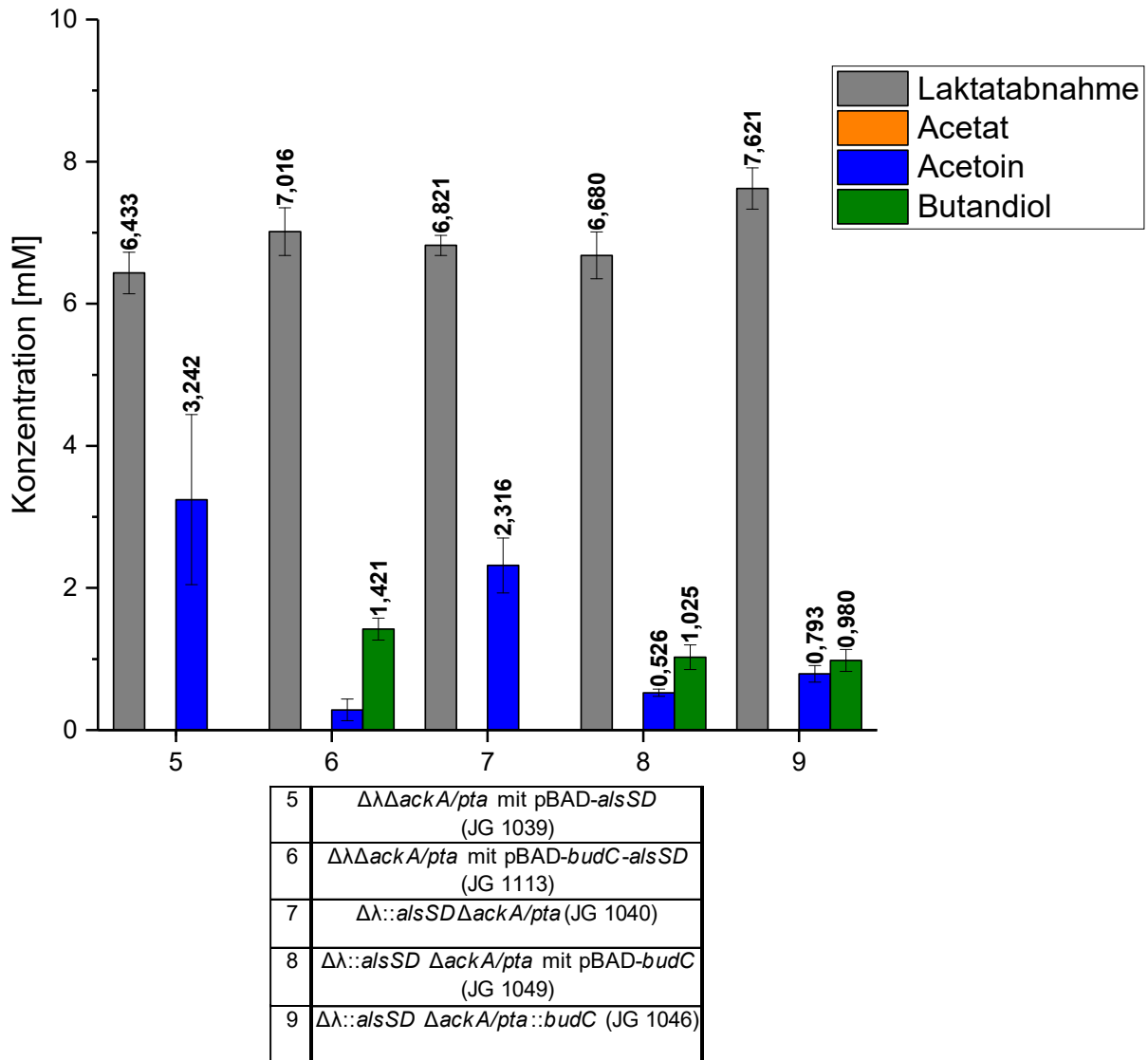


Abbildung 11: HPLC-Daten der Zellsuspensionsassays nach 4 Stunden des Experiments. Die Kulturen mit Plasmid wurden mit 0,1 mM Arabinose induziert und 50 µg/ml Kanamycin zum Erhalt des Plasmids hinzugegeben. Die genomisch integrierten Gene wurden mit 5 mM Arabinose induziert. Diese Stämme tragen keine Resistenz. Der Zellsuspensionsassay wurde mit 10 mM Laktat als Elektronendonator und 20 mM Fumarat als Elektronenakzeptor durchgeführt.

Der Stamm $\Delta\lambda\Delta ackA/pta$ mit pBAD-*alsSD* (JG 1039) bildete aus 6,43 mM Laktat 3,24 mM Acetoin. 7,02 mM Laktat wurden von dem Stamm $\Delta\lambda \Delta ackA/pta$ mit pBAD-*budC-alsSD* (JG 1113) in 0,284 mM Acetoin und 1,42 mM Butandiol umgesetzt. Der Stamm $\Delta\lambda::alsSD \Delta ackA/pta$ (JG 1040) bildete aus 6,82 mM Laktat 2,32 mM Acetoin. Nach Integration des Butandiol-Plasmids, $\Delta\lambda::alsSD \Delta ackA/pta$ mit pBAD-*budC* (JG 1049), wurden aus 6,68 mM Laktat 0,526 mM Acetoin und 1,03 mM Butandiol gebildet. Nach der genomischen Integration der Butandiol-Dehydrogenase in den *ackA/pta*-Lokus ($\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta::budC$ (JG 1046)) setzte der Stamm 7,62 mM Laktat zu 0,793 mM Acetoin und 0,98 mM Butandiol um.

Neben der Produktion von Acetoin und Butandiol in Zellsuspensionsassays wurde ebenfalls die BEC-Performance getestet.

4.2.1.3 Ausbeuten

Zur Übersicht über die Produktivität der einzelnen Stämme wurde berechnet, wie viel Mol Laktat in das jeweilige Produkt umgesetzt wurde. Hierfür diente die Annahme zur Berechnung, dass aus zwei Mol Laktat zwei Mol Acetat oder ein Mol Acetoin bzw. Butandiol gebildet werden können. Dadurch ergibt sich die Ausbeute des theoretischen Maximums.

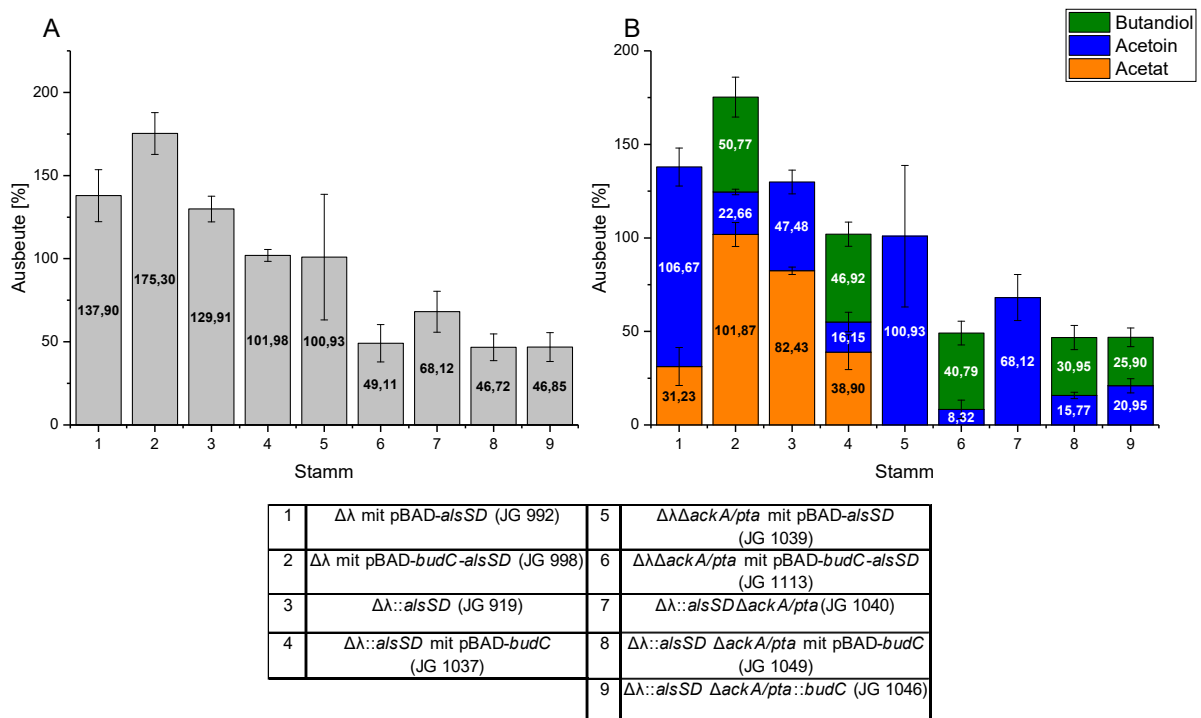


Abbildung 12: Kohlenstoffausbeute und Einzellistungen der Produktausbeuten nach 4 Stunden der Zellsuspensionsassays zu den einzelnen Stämmen. Die Angaben sind in Prozent des theoretischen Maximums dargestellt. A: Gesamtausbeute in Prozent von allen Produkten zu verbrauchtem Substrat. B: Unterteilung der Ausbeuten in die entstandenen Produkte in Prozent.

Hierbei zeigten die Stämme, die Acetat bilden konnten, Acetoinausbeuten von $106,7 \pm 10,2\%$ (Stamm JG 992) und Butandiolausbeuten von maximal $50,8 \pm 10,7\%$ (Stamm JG 998). Allerdings sind in diesen Fällen die Kohlenstoffbilanzen nicht ausgeglichen. Es wird zu viel Produkt für den erfassten Substratumsatz gebildet.

Nach der Deletion der Acetatsynthese-Gene lag die maximale Acetoinausbeute bei $100,9 \pm 37,8\%$ (Stamm JG 1039) und Butandiolausbeute auf $40,8 \pm 6,4\%$ (Stamm JG 1113). Auch hier sind die Kohlenstoffbilanzen nicht ausgeglichen. Allerdings wird

hier, außer bei dem Stamm JG 1039, nicht das gesamte Laktat in den Produkten wiedergefunden.

4.3 Bioelektrochemische Zellen

In diesen Experimenten wurde eine OD_{600} von 0,5 der *S. oneidensis*-Stämme eingesetzt. Die Stämme wurden in 10 mM Laktat PBS-Anodenmedium inokuliert und anschließend in die bioelektrochemischen Systeme überführt. Unter kontinuierlicher N_2 -Begasung wurden die Zellen bei 30°C unter Anlegen eines Potentials inkubiert. Zu den Plasmid-tragenden Stämmen wurde 50 µg/ml Kanamycin zugegeben und 0,1 mM Arabinose zum Induzieren. Die genomisch integrierten Gene wurden mit 5 mM Arabinose induziert. Die Berechnung der Stromdichte erfolgte mittels Integration über die Zeit in den SI-Einheiten Ampere und Sekunde. Im Anschluss wurden die berechneten Coulomb durch die Laufzeit in Sekunden und die Anodenfläche geteilt.

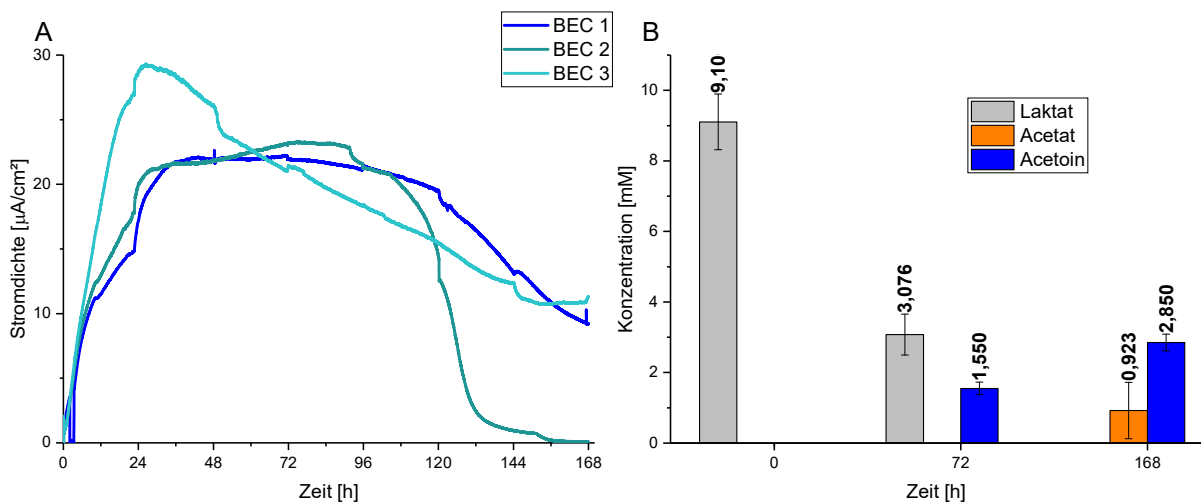


Abbildung 13: Ergebnisse des BEC-Laufs mit *S. oneidensis* $\Delta\lambda$ mit pBAD-alsSD (JG 992) in PBS-Anodenmedium mit 10 mM Laktat als Substrat (vorinduziert). Die Induktion erfolgte mittels 0,1 mM Arabinose und Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin um das Plasmid stabil in den Zellen zu halten. A: Stromdichte über 168h des Triplikats. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Mit dem Stamm $\Delta\lambda$ mit pBAD-alsSD (JG 992) wurde über 168 Stunden ein durchschnittlicher Strom von $18,00 \pm 0,45 \mu A/cm^2$ erreicht, dabei wurden 2,85 mM Acetoin gebildet.

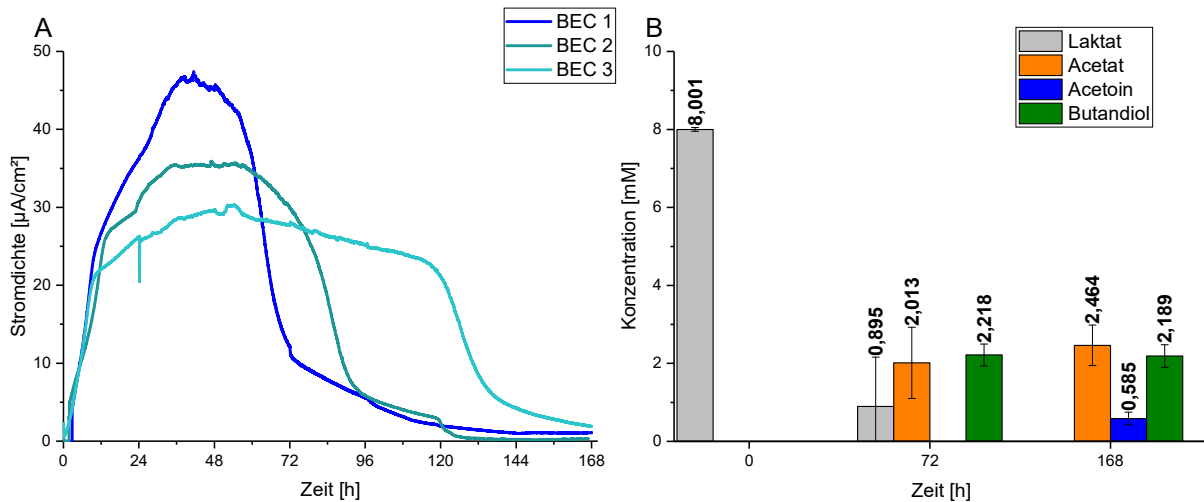


Abbildung 14: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda$ mit *pBAD-budC-alsSD* (JG 998) in PBS-Anodenmedium mit 10 mM Laktat als Substrat. Die Induktion erfolgte mittels 0,1 mM Arabinose und Zugabe von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin um das Plasmid stabil in den Zellen zu halten. A: Stromdichte über 168h des Triplikats. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikats.

Das BEC-Experiment mit dem Stamm $\Delta\lambda$ mit *pBAD-budC-alsSD* führte zu einem Durchschnittstrom von $17,26 \pm 1,84 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und einer Produktion von 2,46 mM Acetat, 0,585 mM Acetoin und 2,19 mM Butandiol aus 8 mM Laktat.

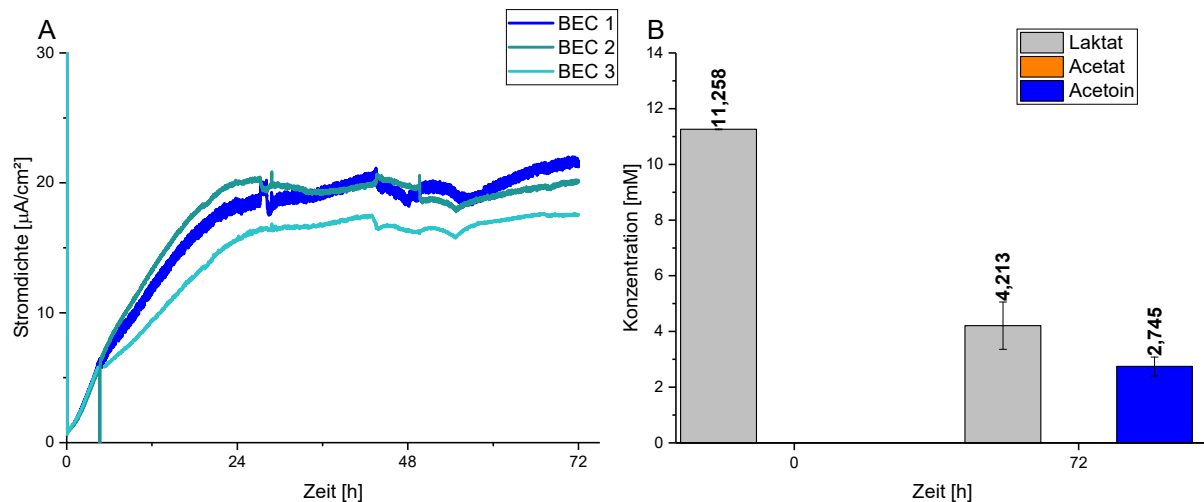


Abbildung 15: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda\Delta\text{ackA}/\text{pta}$ mit *pBAD-alsSD* (JG 1039) in M4-Anodenmedium mit 10 mM Laktat als Substrat. Die Induktion erfolgte mittels 0,1 mM Arabinose und Zugabe von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin um das Plasmid stabil in den Zellen zu halten. A: Stromdichte über 72h des Triplikats. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikats.

Mit dem BEC-Experiment des Stammes $\Delta\lambda\Delta\text{ackA}/\text{pta}$ mit *pBAD-alsSD* (JG 1039) in M4-Medium führte zu einem Durchschnittstrom von $15,57 \pm 1,28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und einer Produktion von 2,745 mM Acetoin aus 7 mM Laktat.

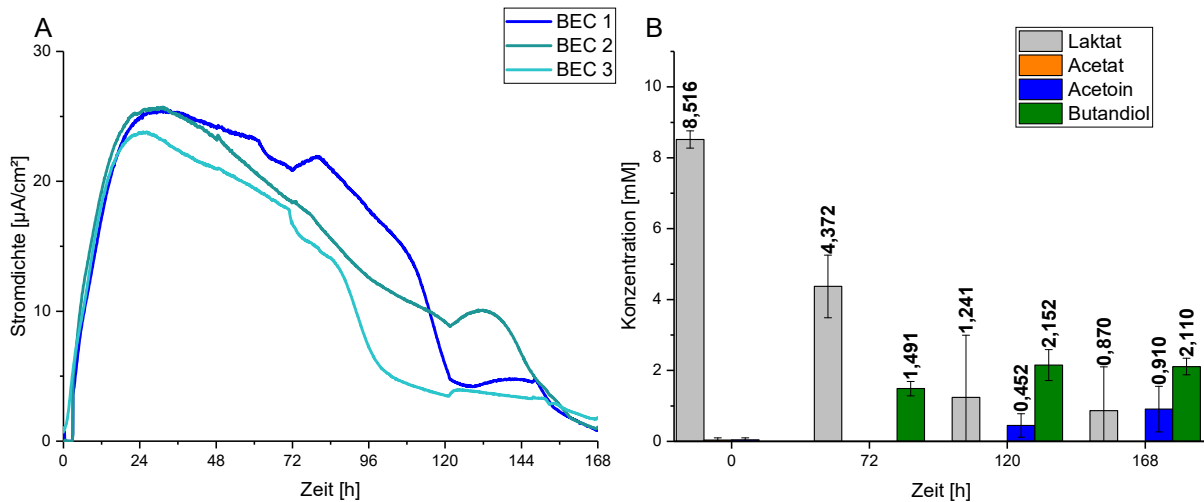


Abbildung 16: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\Delta\Delta\text{lackA}/\text{pta}$ mit $\text{pBAD-}bud\text{C-}als\text{SD}$ (JG 1113) in PBS-Anodenmedium mit 10 mM Laktat als Substrat. Die Induktion erfolgte mittels 0,1 mM Arabinose und Zugabe von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin um das Plasmid stabil in den Zellen zu halten. A: Stromdichte über 168h des Triplikats. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Mit Stamm $\Delta\Delta\Delta\text{lackA}/\text{pta}$ mit $\text{pBAD-}bud\text{C-}als\text{SD}$ wurde neben einer Produktion von 0,91 mM Acetoin und 2,11 mM Butandiol ein Durchschnittsstrom von $13,53 \pm 2,75 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen.

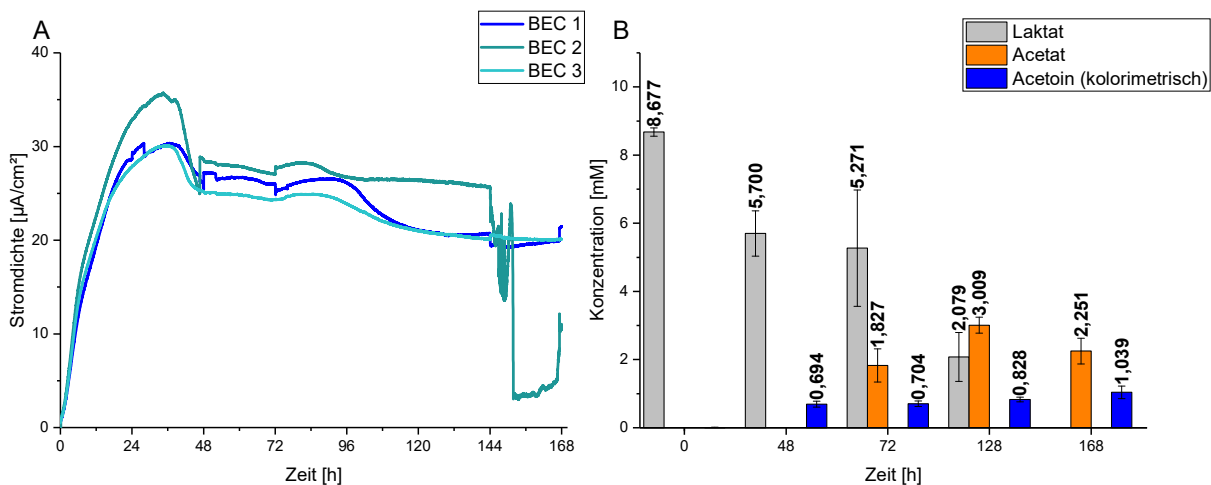


Abbildung 17: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\Delta::als\text{SD}$ (JG 919) (vorinduziert) in PBS-Anodenmedium mit 10 mM Laktat als Substrat. Die Induktion erfolgte mittels 5 mM Arabinose. A: Stromdichte über 168h des Triplikats. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Das BEC-Experiment mit dem Stamm mit den genomisch integrierten Acetoinengen führte zu einer Acetoinproduktion von 1,04 mM und 2,25 mM Acetat aus 8,68 mM Laktat. Hierbei wurde ein Durchschnittsstrom von $24,11 \pm 0,71 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ aufgezeichnet. In diesem Experiment wurden die Zellen vorinduziert um eine erhöhte Acetoinausbeute zu erzielen. Die Messung von Acetoin erfolgte hier kolorimetrisch, da die HPLC niedrige Acetoinwerte ($<1\text{mM}$) nicht genau detektiert. Jedes Experiment bei dem Acetoin produziert wurde, wurde zum einen kolorimetrisch als auch via HPLC

ausgewertet. Waren die Acetoinwerte auf HPLC und kolorimetrischer Messung deckungsgleich wurden die HPLC-Werte dargestellt.

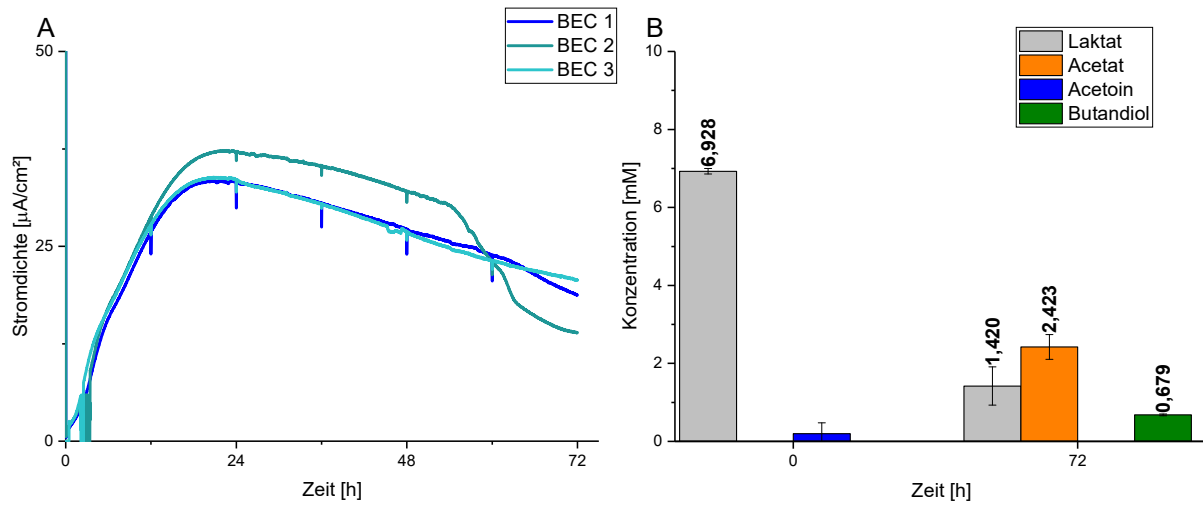


Abbildung 18: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD$ mit $pBAD-budC$ (JG 1037) in PBS-Anodenmedium mit 10 mM Laktat als Substrat. Die Induktion erfolgte mittels 5 mM Arabinose und Zugabe von 50 $\mu g/ml$ Kanamycin um das Plasmid stabil in den Zellen zu halten. A: Stromdichte über 72h des Triplikats. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikats.

Der Stamm der zusätzlich Butandiol über das $pBAD$ -Plasmid bilden kann, $\Delta\lambda::alsSD$ mit $pBAD-budC$, zeigte in einem Experiment über 72h eine Stromproduktion von $26,42 \pm 0,92 \mu A/cm^2$. In dieser Zeit wurden 0,679 mM Butandiol und 2,42 mM Acetat gebildet und 5,51 mM Laktat verbraucht.

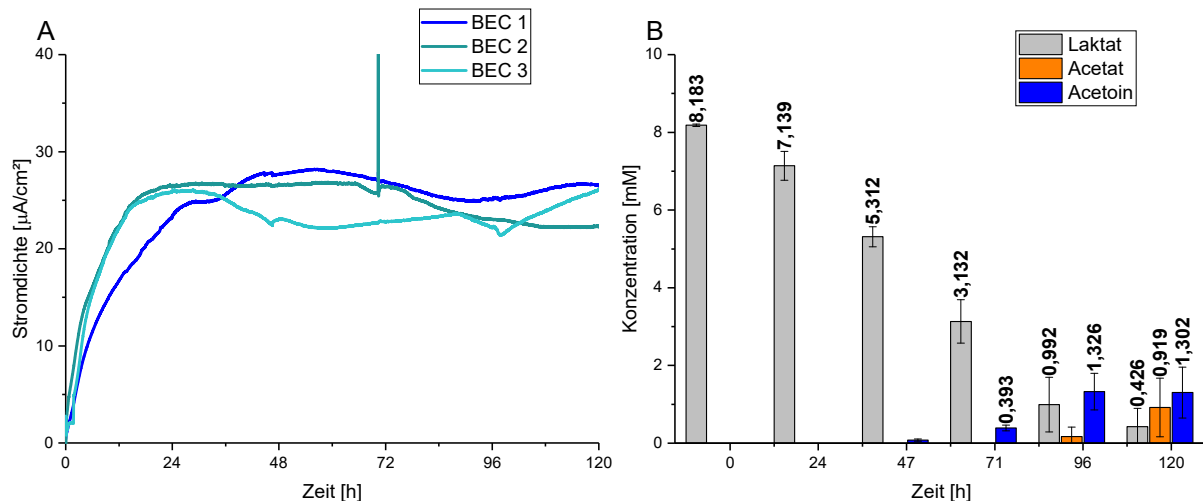


Abbildung 19: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD \Delta ackA/pta$ (JG 1040) (vorinduziert) in PBS-Anodenmedium mit 10 mM Laktat als Substrat. Die Induktion erfolgte mittels 5 mM Arabinose. A: Stromdichte über 120h des Triplikats. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikats.

Die Deletion der Acetatgene im Stamm mit den genomisch integrierten Acetoinengen, $\Delta\lambda::alsSD \Delta ackA/pta$ (JG 1040), führte zu einer Stromproduktion von $23,57 \pm 0,67 \mu A/cm^2$ bei einer vorinduzierten Vorkultur. Dabei wurde nach 120 Stunden 1,3 mM Acetoin gebildet. In Zellsuspensionsassay konnte nach

Aufbrauchen des Substrats und beginnendem OD-Abfall Acetat im Medium nachgewiesen werden. Hier ist ebenfalls nach Laktatverbrauch Acetat im Medium nachweisbar.

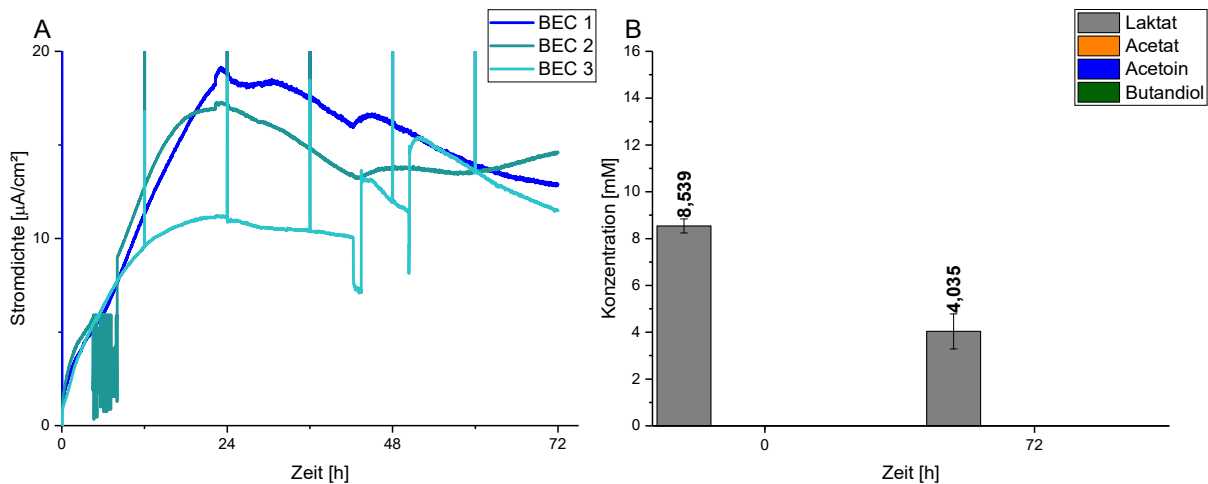


Abbildung 20: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD \Delta ackA/pta$ mit $pBAD-budC$ (JG 1049) in PBS-Anodenmedium mit 10 mM Laktat, 5 mM Arabinose und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin. A: Stromdichte über 72h. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Die Integration des Butandiol-Plasmids führte zu einem Durchschnittsstrom von $12,84 \pm 1,49 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und keiner Produktion von Butandiol in dieser Zeit.

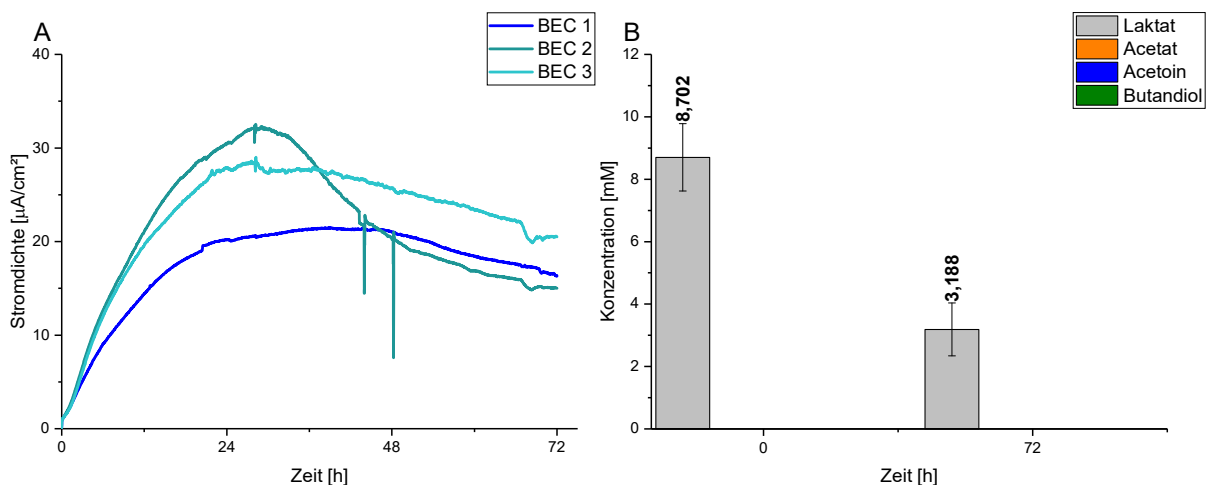


Abbildung 21: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD \Delta ackA/pta::budC$ (JG 1046) in PBS-Anodenmedium mit 10 mM Laktat und 5 mM Arabinose. A: Stromdichte über 72h. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Nach der genomischen Integration der Butandiol-Dehydrogenase zeigte der Stamm einen Durchschnittsstrom von $20,55 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Die Produktion von Butandiol belief sich auf eine kaum detektierbare Menge innerhalb von 72h.

Da die Ausbeuten dieser Versuche noch Steigerungspotential besitzen, wurde nun an einer Erhöhung der Produktivität gearbeitet.

In parallelen Ansätzen wurden einige der Stämme mit elektrogesponnenem Material getestet und dabei wurde festgestellt, dass eine Deletion von *ackA* und *pta* zu keiner Stromproduktion mit diesem Material mehr führte (Edel, 2018). Wohingegen die Produktionsstämme mit Acetat und auch die jeweiligen Wildtypen kein Defizit aufwiesen. Zudem zeigte die $\Delta\lambda$ -Mutante einen 2,5fach höheren Strom im Vergleich zum *S. oneidensis*-Wildtyp (Edel, 2018).

Um die Produktivität mittels elektrogesponnenem Material zu erreichen, wurden verschiedene Wege getestet.

Die Cokultivierung des Stammes JG 919, $\Delta\lambda::alsSD$, mit *G. sulfurreducens* wurde zunächst getestet da dieser die höchste durchschnittliche Stromdichte der Acetoinproduzenten zeigte. Hierbei war die Idee *S. oneidensis* in eine leitfähige *G. sulfurreducens*-Matrix einzubetten. *G. sulfurreducens* zieht seinen Nutzen aus dieser Co-Kultivierung, indem er das von *S. oneidensis* unter anaeroben Bedingungen produzierte Acetat verstoffwechseln kann.

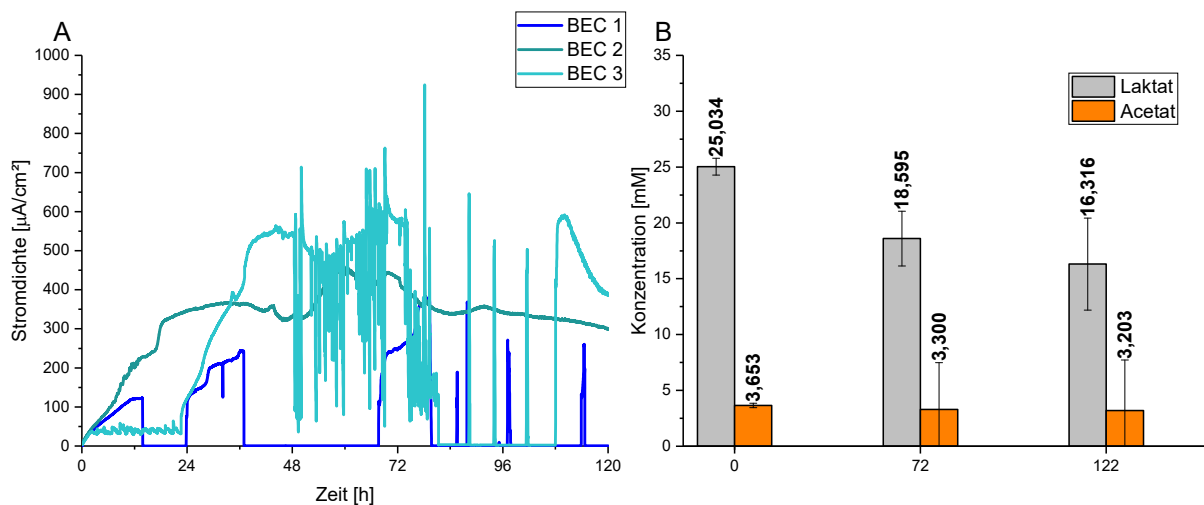


Abbildung 22: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD$ (JG 919) mit *G. sulfurreducens* (JG 407) in Cokultur-Anodenmedium mit 25 mM Laktat, 5 mM Acetat und 5 mM Arabinose. A: Stromdichte über 122 h. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

In diesem Ansatz konnte nach 122 Stunden kein Acetoin detektiert werden. Laktat nimmt über diese Zeit circa um 10 mM ab, während Acetat über die gesamte Zeit zu detektieren war. Es wurde ein durchschnittlicher Strom von $214,69 \pm 112,83 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen.

Da kein Acetoin nachgewiesen werden konnte bzw. nur in sehr geringen Spuren, ist eine Optimierung des Systems erforderlich. Hierfür kann eine Cokultur ohne metabolisches Zusammenspiel genutzt werden. Um einen Flux in Richtung Acetat zu

vermeiden, wurde im nächsten Ansatz der Stamm $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ in der Cokultur eingesetzt.

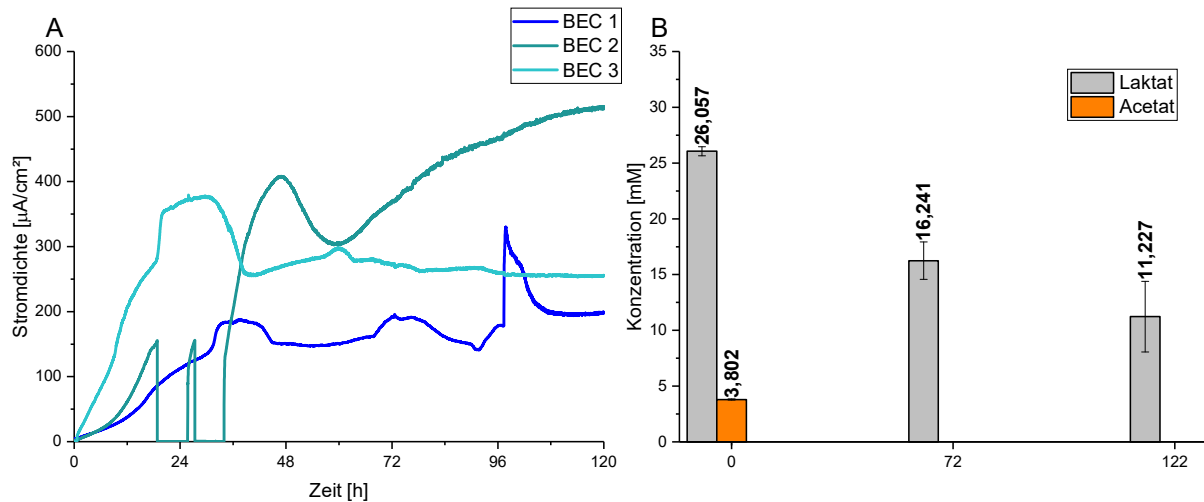


Abbildung 23: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) mit *G. sulfurreducens* (JG 407) in Cokultur-Anodenmedium mit 25 mM Laktat, 5 mM Acetat und 5 mM Arabinose. A: Stromdichte über 122h. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Hierbei wurde in dieser Zeit etwa 15 mM Laktat abgebaut und es war nur zu Beginn Acetat detektierbar. Auch in diesem Ansatz konnten nur Spuren von Acetoin nachgewiesen werden. Es wurde ein durchschnittlicher Strom von $237,19 \pm 63,64 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen.

Da die Co-Kultivierung zunächst zu keiner gesteigerten Acetoinproduktion führte, wurde im Weiteren eine Lösung für die Anabolismus-Defizite der Acetat-Deletionsmutante gesucht. Unter aeroben Bedingungen weist die Mutante kein Wachstumsdefizit auf, da der Citratzyklus vollständig durchlaufen werden kann. So könnte eine Änderung des Anodenpotentials Abhilfe verschaffen. Hierbei zeigen Hirose et al. (2018) eine unterschiedliche Stromproduktion durch *S. oneidensis* beim Anlegen eines niedrigen Potentials von 0 (engl.: *low potential* (LP)) oder eines hohen Potentials von +500 mV (engl.: *high potential* (HP)) gegen SHE (Hirose et al., 2018). Sie postulieren zusätzlich, dass bei Anlegen eines hohen Potentials der Citratzyklus aktiv ist. Sie stützen dies zum einen auf das Messen von Ubichinon in oxidiertem Zustand als auch Transkriptomdaten (Hirose et al., 2018).

Somit wurde der Stamm $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) in Monokultur in bioelektrochemischen Systemen getestet, in denen über vier Stunden ein Potential von 0 mV gegen NHE und anschließend +500 mV gegen NHE angelegt wurde. In diesen

Versuchen wurde die Vorkultur bereits induziert um möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen.

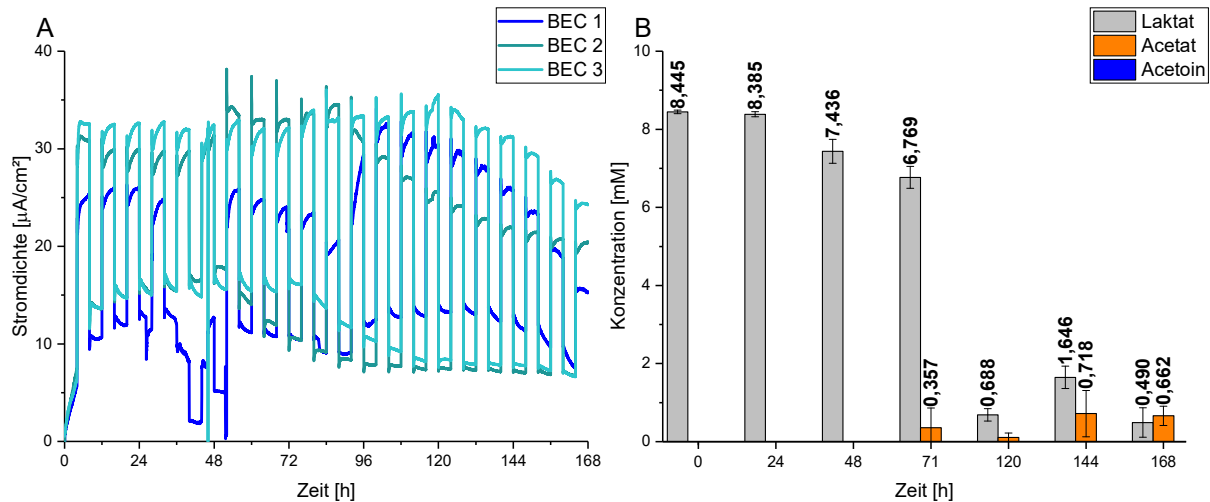


Abbildung 24: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) mit 10 mM Laktat und 5 mM Arabinose. A: Stromdichte über 168h, mit einem Potentialwechsel alle 4h von 0 auf +500 mV vs. NHE. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Bei einem kontinuierlichen Wechsel zwischen den Potentialen alle vier Stunden, zeigt die Stromkurve bei jedem Potentialwechsel einen Sprung. Werte um 1 mA wurden bei dem Potential von +500 mV gemessen und bei 0 mV Werte um 500 μA . Vom Substrat Laktat werden über 168 Stunden circa 8 mM umgesetzt, während kein Acetoin auf der HPLC nachgewiesen werden kann. Die Proben wurden immer beim 0 mV-Potential entnommen. Auch hier konnte Acetat in geringen Mengen detektiert werden. Es wurde eine durchschnittliche Stromdichte von $19,24 + 2,31 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen.

Im Weiteren wurde die Frequenz des Potentialwechsels gesenkt. Hierbei wurde für 4h ein Potential von +500 angelegt und anschließend für 20h das gewohnte Potential von 0 mV.

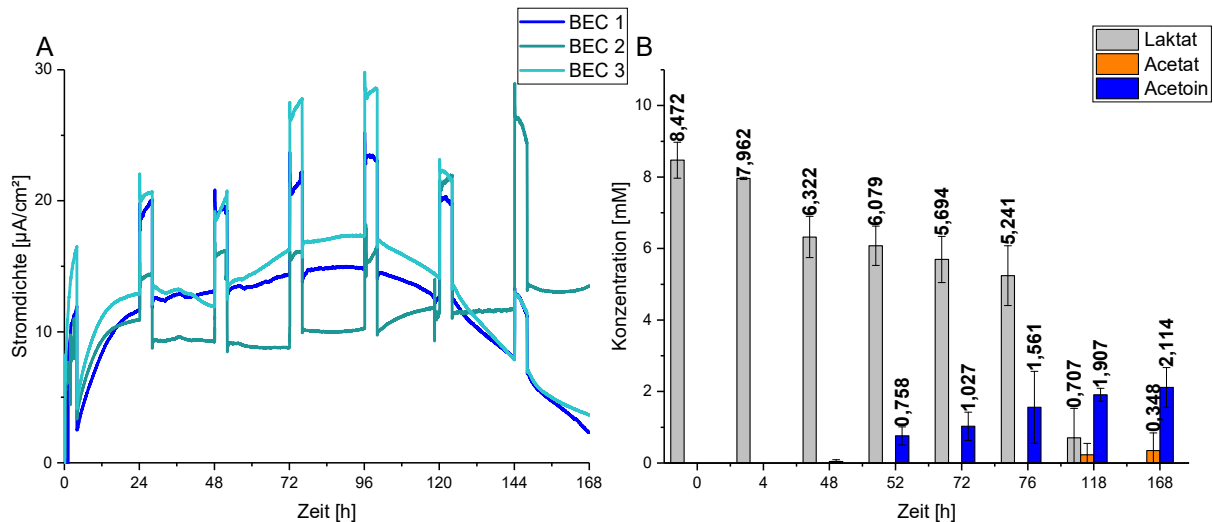


Abbildung 25: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) mit 10 mM Laktat und 5 mM Arabinose. A: Stromdichte über 168h, mit einem Potentialwechsel 4h auf +500 mV vs. NHE zu 0 mV über 20h. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Über 168 Stunden wird das gesamte Laktat umgesetzt und dabei 2,114 mM Acetoin gebildet. Auch hier sieht man die Sprünge im Chronoamperogramm bei den Potentialwechseln deutlich. Die Sprünge sind zum vorherigen Verlauf vergleichbar. Es wurde ein durchschnittlicher Strom von $12,99 \pm 0,70 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen.

Zusätzlich ist zu vermerken, dass bei diesem Versuch in den 4 Stunden hohen Potential 0,51 mM $\pm 0,477$ Laktat abgebaut werden. Von 48 h auf 52 Stunden werden 0,243 mM $\pm 0,089$ Laktat abgebaut. Ein weiterer 4-Stundenwert wurde bei dem Potentialwechsel von 72 auf 76 Stunden gemessen und die Laktatabnahme betrug hier 0,454 mM $\pm 0,987$. In diesen Zeiträumen wurden 0 mM, 0,711 mM $\pm 0,218$ und 0,534 mM $\pm 0,809$ Acetoin gebildet.

Des Weiteren wurde diese Experiment mit dem Butandiolproduzenten $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta::budC$ (JG 1046), ebenfalls mit einer induzierten Vorkultur durchgeführt.

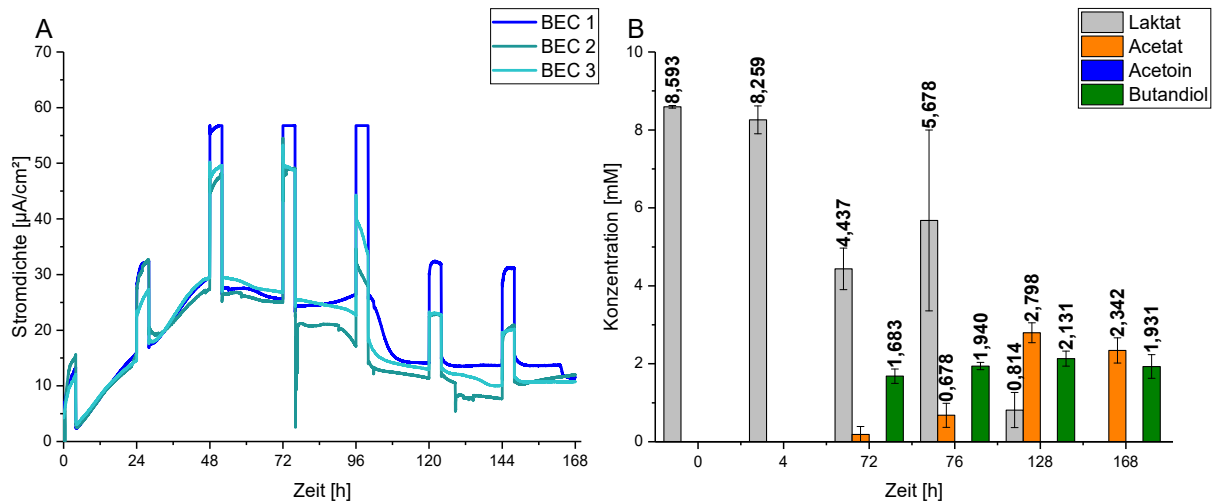


Abbildung 26: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta::budC$ (JG 1046) mit 10 mM Laktat und 5 mM Arabinose. A: Stromkurve über 168h, mit einem Potentialwechsel 4h auf +500 mV vs. NHE zu 0 mV über 20h. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikat.

Hierbei wurden 1,9 mM Butandiol und 2,34 mM Acetat (nach Aufbrauchen von Laktat) produziert aus 8,6 mM Laktat.

Um eine bessere Aussage über die Abnahme- und Produktionsraten treffen zu können wurden die Potentiale über 168h angelegt.

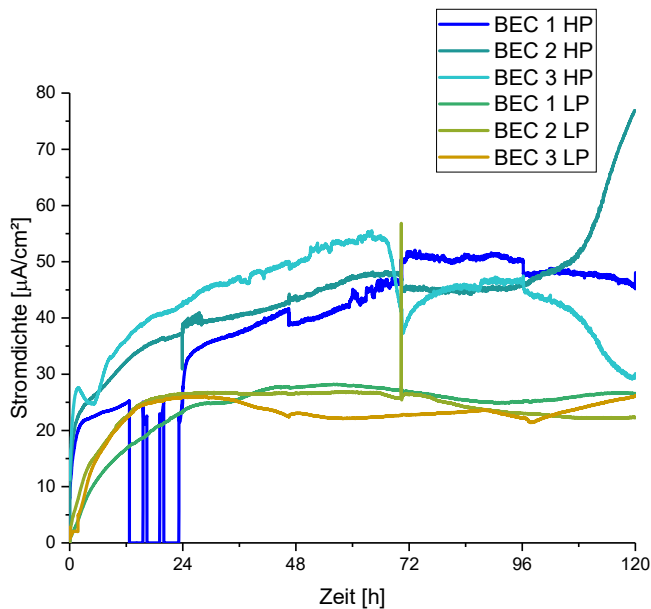


Abbildung 27: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) mit 10 mM Laktat und 5 mM Arabinose. Stromdichte über 168h mit einem konstanten Potential von +500 mV gegen NHE (BEC 1-3 HP) und 0 mV gegen NHE (BEC 1-3 LP).

Hierbei zeigte sich für den Lauf bei hohem Potential (+500 mV gegen NHE (HP)) eine durchschnittliche Stromdichte über 120h von $41,84 \pm 2,32 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Wohingegen bei dem niedrigen Standardpotential von 0 mV (LP) gegen NHE $23,57 \pm 0,67 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

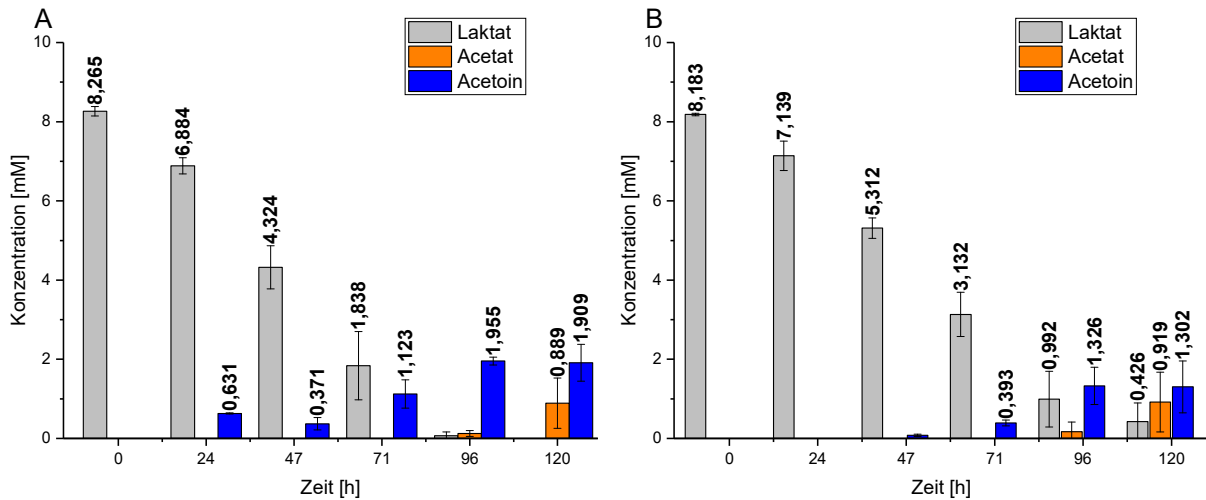


Abbildung 28: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) mit 10 mM Laktat und 5 mM Arabinose. A: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikate aus dem Lauf bei +500 mV gegen NHE über 168h. B: HPLC-Daten gemittelt aus dem Triplikate aus dem Lauf bei 0 mV gegen NHE über 168h.

Aus circa 8 mM Laktat werden 1,91 mM Acetoin im hohen Potential gebildet und 1,3 mM mit niedrigem Potential nach 120h Laufzeit. In diesem Ansatz wird wieder nach Aufbrauchen des Substrats Acetat gebildet, obwohl der Stamm nicht mehr über die Acetatkinase und Phosphotransacetylase verfügt.

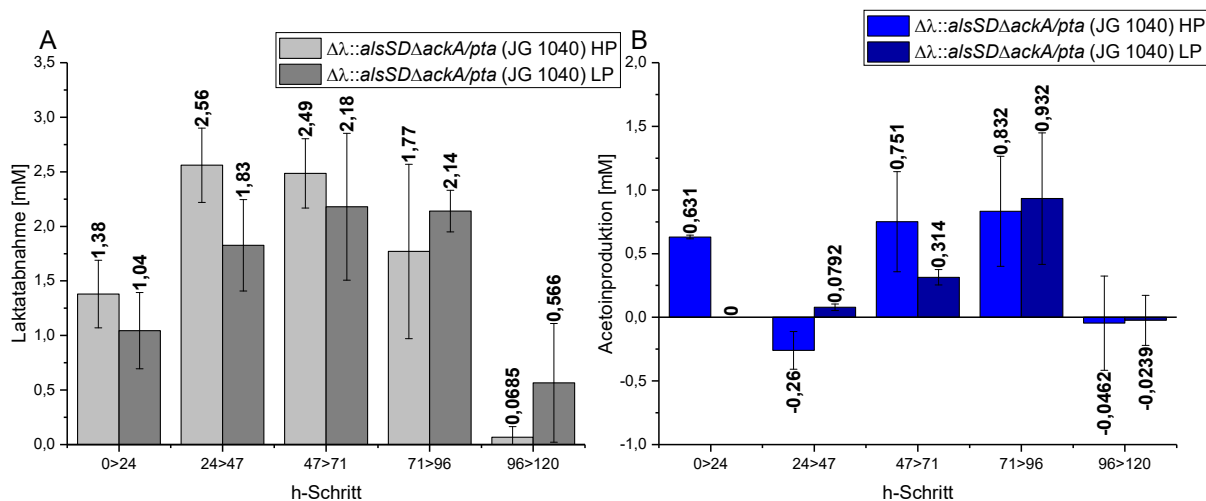


Abbildung 29: Darstellung der Substratabnahme und Produktion von Acetoin aus dem BEC-Experiment mit dem Stamm $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) und einem Potential von +500 mV gegen NHE (HP) und 0 mV gegen NHE (LP) über 168h A:Laktatabnahme gemittelt aus den Triplikaten. B: Acetoinproduktion gemittelt aus den Triplikaten.

Hierbei zeigte sich zusätzlich, dass zu Beginn von beiden Ansätzen etwa 1 mM Laktat in 24 Stunden umgesetzt werden. Die Laktatumsatzrate nimmt im hohen Potential auf etwa 2,5 mM/23h bzw. 24h zu und sinkt dann auf 1,77 mM/25h bzw. annähernd 0, da das Laktat aufgebraucht ist. Im niederen Potential gibt es einen Anstieg bis etwa 2,18 mM/24h und auch dann einen Abfall auf 0 bei Aufbrauchen des Substrates.

Während unter niederem Potential die Acetoinproduktionsrate von 0 auf 0,932 mM/25h ansteigt. Ist bei hohem Potential eine kurze Stagnation der Produktion zu erkennen.

Mit diesen Ergebnissen wurde eine Cokultivierung mit *G. sulfurreducens* durchgeführt mit einem Potentialwechsel von 4h und 20h und Vorinduktion der *S. oneidensis*-Kultur um eine Produktion von Acetoin nachweisen zu können.

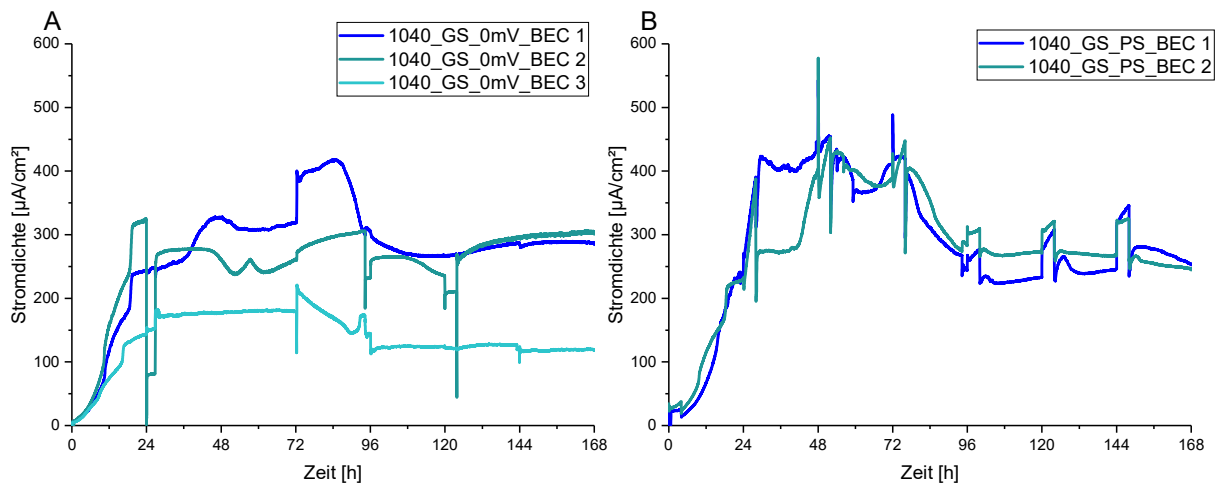


Abbildung 30: Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) in Cokultivierung mit *G. sulfurreducens* (JG 407) mit 25 mM Laktat, 5mM Acetat als Substrat und 5 mM Arabinose zur Induktion. **A:** Stromdichte über 168h mit einem Potential von 0 mV gegen NHE als Kontrolle. **B:** Stromdichte mit einem Potentialwechsel von 4h auf +500 mV vs. NHE und über 20h auf 0 mV gegen NHE.

Die Cokultivierung von *G. sulfurreducens* mit dem *S. oneidensis*-Stamm $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) in BEC-Experimenten wurde mit konstantem Potential von 0 mV gegen NHE angelegt und zeigte eine durchschnittliche Stromdichte von $206,61 \pm 68,59 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Im gleichen Ansatz allerdings mit Potentialwechsel von 4 h auf 500 mV gegen NHE und über 20 h auf 0 mV gegen NHE wurde eine durchschnittliche Stromdichte von $283,19 \pm 1,02 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ über 168 Stunden im Duplikat gemessen. Die dritte BEC zeigte nach dem Beenden des Laufes nach dem Ausplattieren eine Kontamination. In dieser konnte ebenfalls kein Acetoin nachgewiesen werden. Sie wurde bei den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

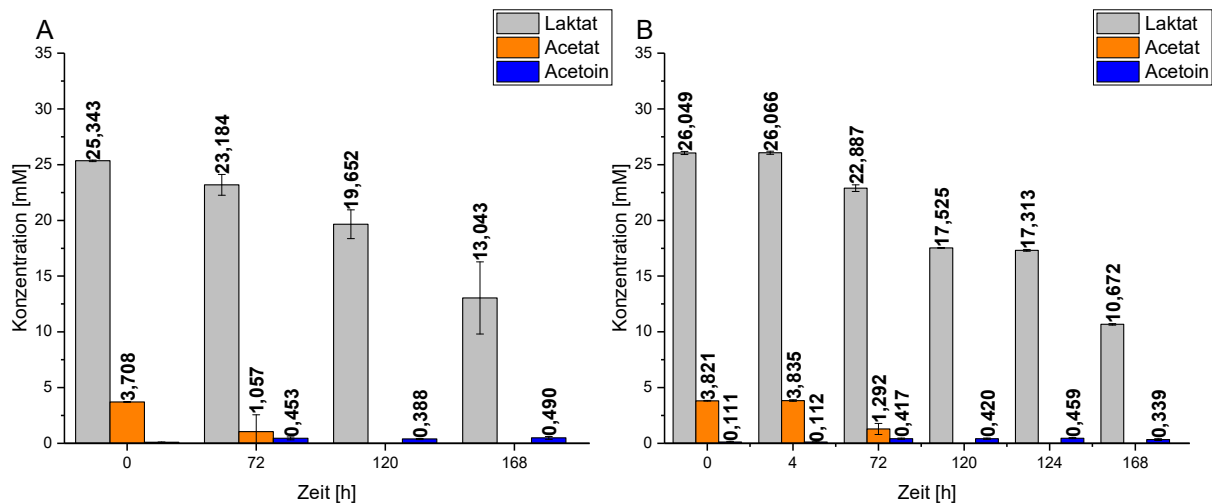


Abbildung 31: HPLC-Ergebnisse des BEC-Laufs mit $\Delta\lambda::alsSD \Delta ackA/pta$ (JG 1040) in Cokultivierung mit *G. sulfurreducens* (JG 407) mit 10 mM Laktat und 5 mM Arabinose. Links: HPLC-Ergebnisse des BEC-Laufs bei 0 mV gegen NHE als Kontrolle. Rechts: HPLC-Ergebnisse des BEC-Laufs bei einem Potentialwechsel von 4 h auf +500 mV vs. NHE und über 20 h auf 0 mV gegen NHE.

In beiden Ansätzen wurde nach Vorinduktion der Vorkultur etwa 0,5 mM Acetoin detektiert. In der HPLC wurde ein Acetoin signal dargestellt, aber nicht ausgewertet, weshalb auf eine kolorimetrische Messung zurückgegriffen wurde.

In Abbildung 32 sind die gemittelten Stromdichten der BEC-Experimente tabellarisch aufgeführt und nach Zeitpunkten getrennt. Da die Experimente zum Teil unterschiedliche Laufzeiten hatten, dient dies der Vergleichbarkeit.

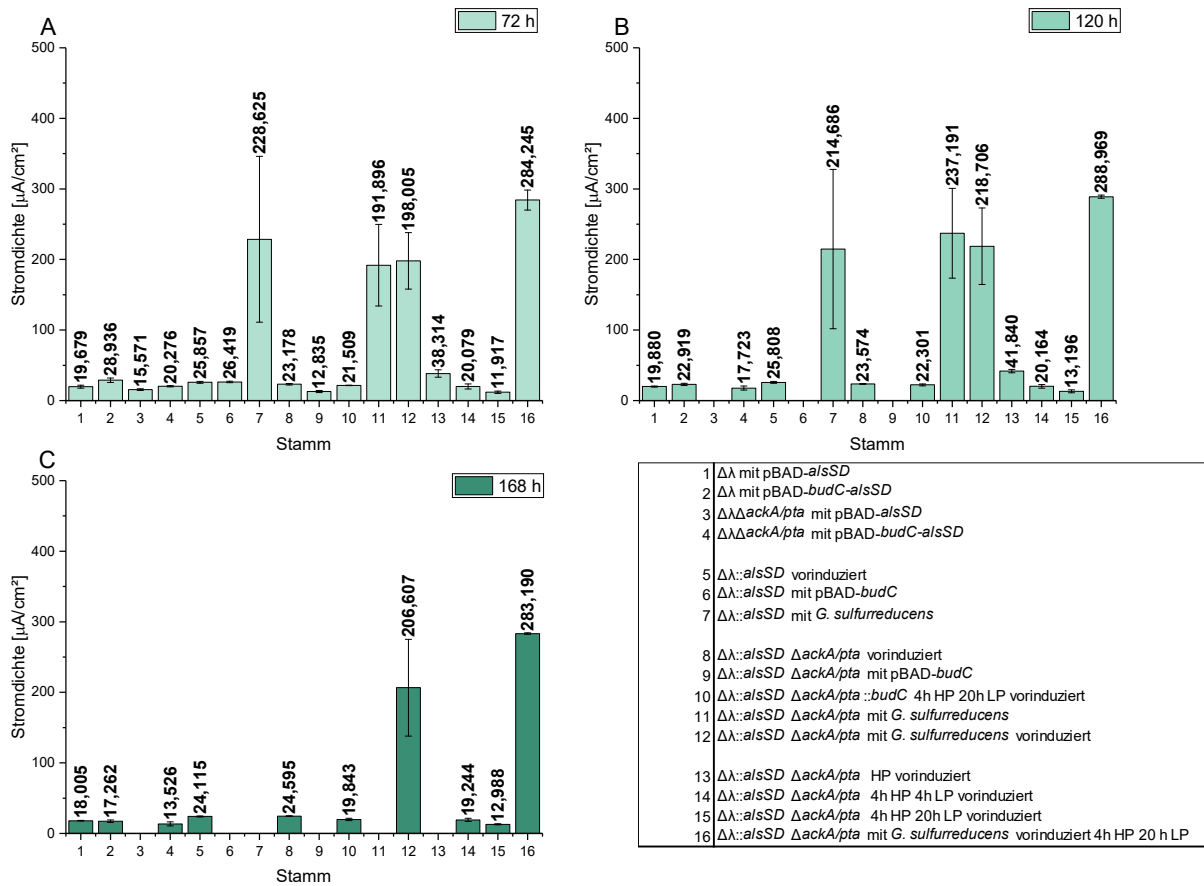


Abbildung 32: Übersicht über alle gemittelten Stromdichten. Zur Vergleichbarkeit in drei Zeitpunkte unterteilt, Laufzeit über 72h (A), Laufzeit über 120h (B) und Laufzeit über 168h (C).

Die Stromdichten bei 72 Stunden können für einen direkten Vergleich zwischen den Stämmen herangezogen werden. Bei den Acetoin-produzierenden Stämmen zeigt der Stamm Nr. 5 ($\Delta\lambda::\text{alsSD}$) mit einer durchschnittlichen Stromdichte von $25,86 \pm 1,43 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ die höchste Stromproduktion in 72h. Der Butandiol-produzierende Stamm Nr. 2 ($\Delta\lambda$ mit pBAD-*budC-alsSD*) zeigt mit $28,94 \pm 3,14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ die beste Performance. In Co-Kultur zeigt der Stamm Nr. 5 ($\Delta\lambda::\text{alsSD}$) mit einer durchschnittlichen Stromdichte $228,63 \pm 117,45 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, allerdings mit großem Fehler. Der Stamm der nicht mehr über AckA und Pta verfügt (Nr. 11/12 ($\Delta\lambda::\text{alsSD}\Delta\text{ackA}/\text{pta}$)) zeigte eine durchschnittliche Stromdichte von 191,9 bzw 198 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. So scheint die Vorinduktion keinen Unterschied zu machen. Allerdings spiegelt sich der Potentialswitch in der Stromdichte wieder so ist dieser Stamm mit $284,25 \pm 14,13 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Neben der Stromproduktion können hier ebenfalls die Ausbeuten der Läufe dargestellt werden.

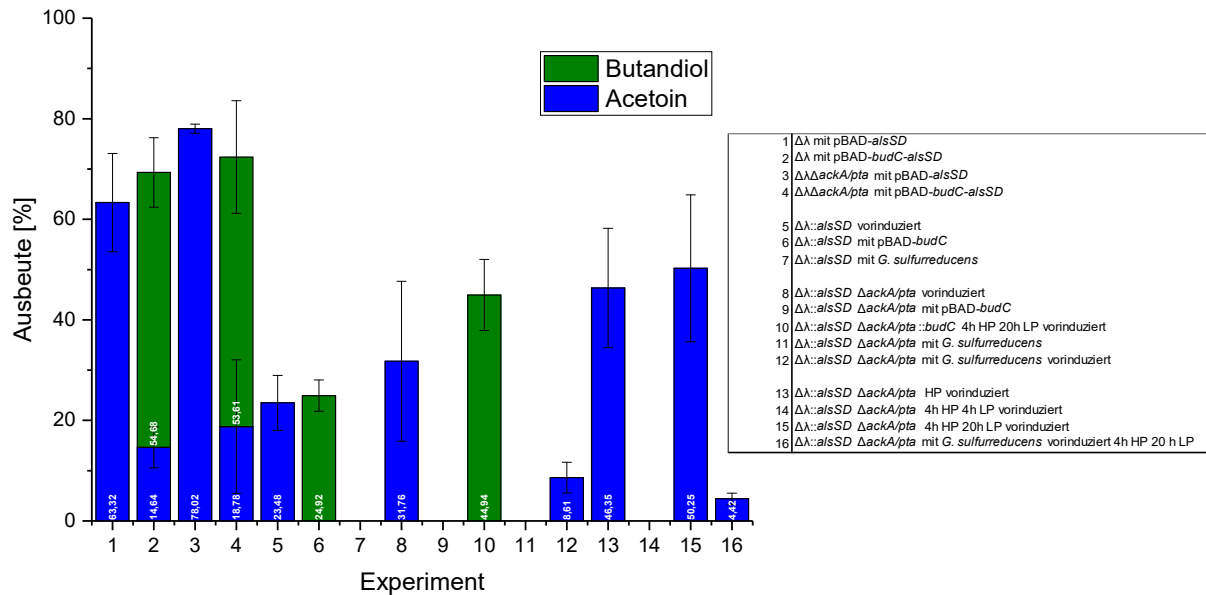


Abbildung 33: Endpunkt-Ausbeuten der BEC-Experimente. In blau ist die Acetoinausbeute und in grün die Butandiolausbeute dargestellt. Acetat wurde in dieser Darstellung nicht berücksichtigt.

Hierbei zeigte sich eine maximale Acetoinausbeute von 78% mit dem Stamm $\Delta\lambda\DeltaackA/pta$ mit pBAD-*alsSD* nach 72h. Gefolgt von $\Delta\lambda$ mit pBAD-*alsSD* mit 63% nach 168h des BEC-Experiments. Die Butandiolausbeute ist bei den Stämmen mit dem pBAD-*budC-alsSD*-Plasmid am größten mit etwa 55%, allerdings ist hierbei etwa zu einem Drittel Acetoin nachweisbar. Eine reine Butandiolausbeute von 45% ist im BEC-Experiment mit dem Stamm $\Delta\lambda::alsSD\DeltaackA/pta::budC$ (Nr. 10) nach Vorinduktion und mit Potentialshift zu verzeichnen. Die Co-Kultivierungen wiesen nur eine geringe Menge oder kein Acetoin auf.

Um eine Aussage über die Effizienzen treffen zu können, wurde des Weiteren die Coulomb Effizienz (CE) berechnet. Hierbei wurde folgende Formel verwendet (nach Kipf *et al.*, 2013):

$$CE = \frac{\int_0^t I}{N_A * e * B * V_{Reaktor} * c_{Produkt}}$$

Formel 1: Erklärung der Abkürzungen: CE=Coulomb Effizienz; $\int_0^t I$ = Integration der Stromkurve in Ampere über die Zeit in Sekunden; N_A =Avogadro-Konstante ($6,022 \cdot 10^{23}/\text{mol}$); e =Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C); B =Anzahl der übertragbaren Elektronen (Mol); $V_{Reaktor}$ =Volumen des Reaktors (L); $c_{Produkt}$ =Menge des Produkts (Mol)

Hierfür wurde 4 Mol Elektronen für die Acetatproduktion, 4 Mol Elektronen für die Acetoinproduktion, 2 Mol für die Butandiolproduktion und 12 Mol je Kohlenstoffdioxid (CO_2) angenommen. Es wird zusätzlich angenommen, dass Laktat, welches nicht in den Produkten wiedergefunden wurde vollständig zu CO_2 oxidiert wird.

Aufgrund des gemischten Produktspektrums wurde für die Experimente eine Gesamt-CE ermittelt. Zur Berechnung der Gesamt-Coulomb Effizienz wurde folgendermaßen verfahren:

$$CE_{gesamt} = \frac{\text{Mol Elektronen (gemessen)}}{\sum \text{Mol Elektronen der Produkte}}$$

In Abbildung 34 sind die CE der BEC-Experimente dargestellt.

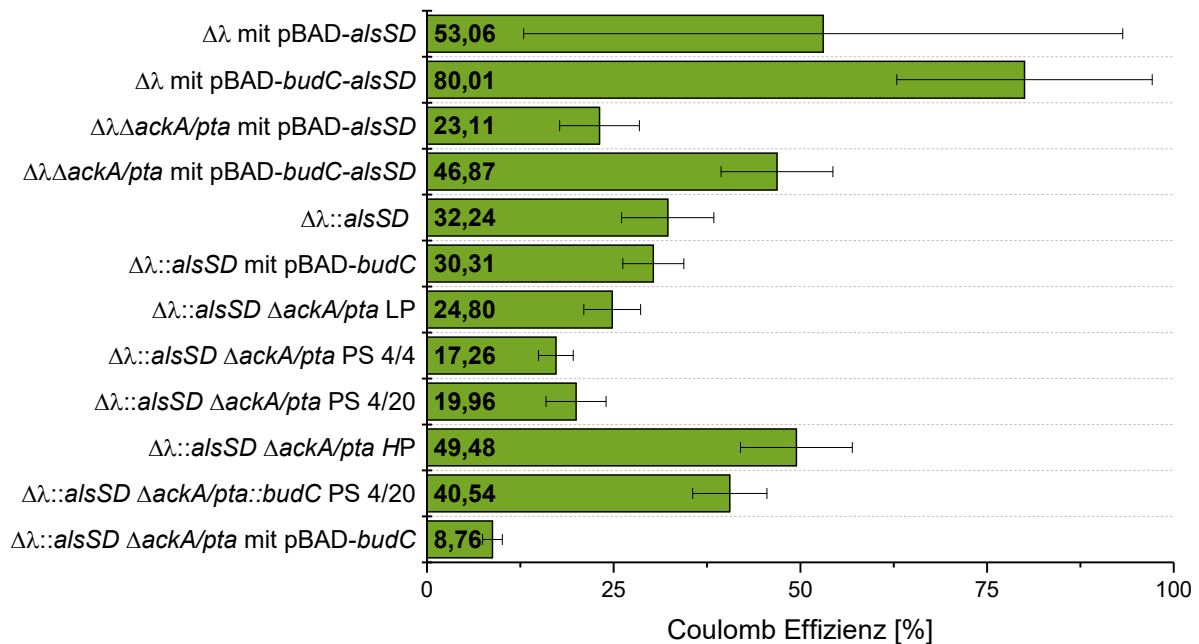


Abbildung 34: Coulomb-Effizienzen der betrachteten Experimente in Bezug auf das Produkt über die jeweilige Laufzeit.

Falls hierbei Werte über 100% entstehen, wird eine nicht erfasste Kohlenstoffquelle als Laktat zusätzlich verwendet. Bei Zahlenwerten kleiner 100% ist von einem Verlust der Elektronen an einen anderen Elektronenakzeptor wie z.B. Sauerstoff auszugehen. Die höchste CE von etwa 80% wurde bei dem Lauf mit dem Stamm $\Delta\lambda$ mit pBAD-*budC-alsSD* (JG 998) erreicht. Gefolgt von $\Delta\lambda$ mit pBAD-*alsSD* (JG 992) mit 53%. Der Stamm $\Delta\lambda\Delta\text{ackA}/\text{pta}$ mit pBAD-*budC-alsSD* (JG 1113) zeigte eine CE von etwa 47% und $\Delta\lambda::\text{alsSD}\Delta\text{ackA}/\text{pta}$ (JG 1040) im Experiment mit einem konstanten Potential von +500 mV gegen NHE eine CE von 49,5%. Die Stämme $\Delta\lambda::\text{alsSD}\Delta\text{ackA}/\text{pta}$ und $\Delta\lambda::\text{alsSD}\Delta\text{ackA}/\text{pta}::\text{budC}$ im Experiment mit einem Potentialwechsel von 4h hohes Potential und 20h eine Potential von 0 mV gegen NHE zeigten eine CE von circa 25% und 40,5%. Alle weiteren Experimente liegen zwischen 30 und 8%.

4.4 Glycerinstoffwechsel

Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol der von Bakterien, wie *Escherichia coli* als Substrat genutzt werden kann. *Shewanella oneidensis* besitzt nach Genomanalyse einige Gene die auch von *E. coli* im Glycerinabbau genutzt werden. Dies ist zum einen die Glycerinkinase (GlpK (SO4230)) und auch die FAD-abhängige Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (SO0978) (Serres and Riley, 2006). Über diese beiden Enzyme könnte Glycerin zu Glycerin-3-Phosphat und anschließend zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgesetzt werden. DHAP wird dann über eine Triose-Isomerase zu Triose-3-Phosphat umgesetzt.

Zunächst wurde über aerobe und anaerobe Wachstumsversuche getestet, ob der *S. oneidensis*-Wildtyp in der Lage ist, mit Glycerin als Substrat zu wachsen. Hierfür wurde der Wildtyp mit einer OD₆₀₀ von 0,05 in 25 ml Erlenmeyer-Kolben inokuliert. Dem Medium wurden 20 mM Glycerin als Substrat zugesetzt. In Kontrollen wurde kein Glycerin zugegeben. Zusätzlich wurde eine anaerobe Wachstumskurve mit Glycerin und Fumarat angesetzt, welche keine OD₆₀₀-Zunahme zeigte. Die beiden aeroben Ansätze zeigten eine OD-Zunahme auf OD₆₀₀ 0,13. Da diese unabhängig von der Glycerinzugabe war, war das Zellwachstum vermutlich auf die Verstoffwechslung der zugesetzten 0,1% Casaminosäuren zurückzuführen. Darum wurde der Versuch mit Medium wiederholt, das nur 0,01% Casaminosäuren enthielt. Hier war kein Wachstum mehr zu detektieren.

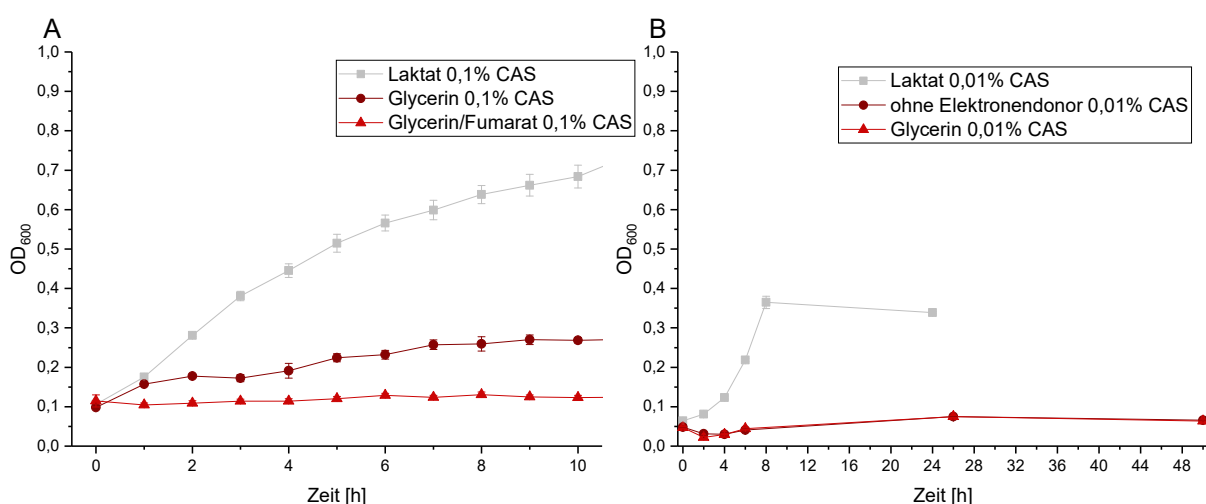


Abbildung 35: Wachstumskurve mit *S. oneidensis* Wildtyp in PBS-Medium mit Laktat als Positivkontrolle und Glycerin unter oxischen Bedingungen. Ein weiterer Ansatz mit Glycerin und Fumarat in PBS-Medium. Mit Laktat zeigt der Wildtyp den gewohnten Verlauf mit einem Anstieg der OD von 0,1 auf 0,68 in 10h. Unter aeroben Bedingungen mit Glycerin und 0,1% CAS steigt die OD von 0,1 auf 0,27, während unter anoxischen Bedingungen kein Wachstum zu verzeichnen ist. Nach Reduktion der Casaminosäuren auf 0,01% ist kein Wachstum auf Glycerin mehr zu verzeichnen. Die Kontrolle auf Laktat wächst von 0,05 auf 0,35.

Die Versuche zeigen, dass Glycerin nicht als Kohlenstoffquelle verwendet werden konnte. Daher wurde ein Stoffwechselweg konzipiert und die entsprechenden codonoptimierten Gene auf einem pUC-Plasmid bei GenScript geordert. Nach einer Genomüberprüfung konnte der Transporter AqdZ identifiziert werden der auch unspezifisch für den Transport von Glycerin zuständig sein kann. Es wurde zunächst von einer funktionellen Glycerinkinase ausgegangen. Darum wurden die Enzyme für einen Abbauweg von Glycerin-3-Phosphat ausgehend integriert. Über Reduktion von NAD^+ zu NADH wird Glycerin-3-Phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) oxidiert. DHAP sollte über die Methylglyoxalsynthase zu Methylglyoxal umgesetzt werden, welches ein Zellgift darstellt (Misra *et al.*, 1995). Daher ist der Organismus darauf angewiesen Methylglyoxal schnell zu verstoffwechseln, welches einen Flux in Richtung Laktat über die Cofaktor-freie Glyoxalase III erzwingen sollte (Misra *et al.*, 1995; Subedi *et al.*, 2011).

Nachdem auch die Integration dieses Stoffwechselwegs *S. oneidensis* nicht dazu befähigte auf Glycerin zu wachsen, wurde da *S. oneidensis* nur über einen unspezifischen Transporter verfügt, zusätzlich GlpF als Glycerin-spezifischer Transporter aus *E. coli* integriert. Dies erfolgte nach dem Restriktionsverdau des bisher genutzten Plasmids mit SpeI, anschließender Dephosphorylierung und einer Gibson-Reaktion mit dem Insert, welches mit den Primern Nr. 26 und 27 hergestellt wurde.

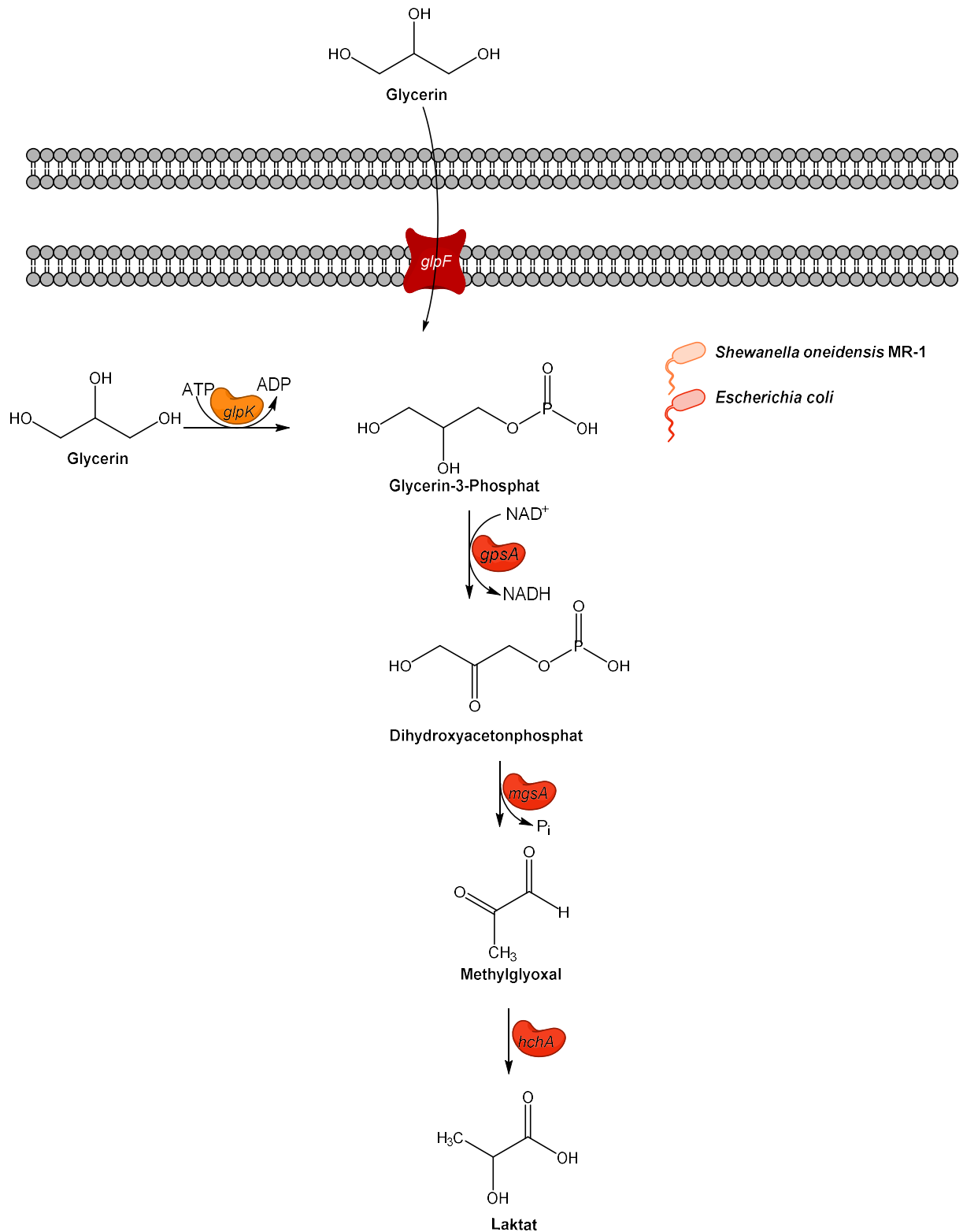


Abbildung 36: Synthetischer Glycerinabbauweg auf einem pBAD-Plasmid. In rot sind die von *E. coli* kommenden Glycerinabbaugene dargestellt und in orange die *S. oneidensis* eigene Glycerinkinase. GlpF ist in der Cytoplasma-Membran lokalisiert (Fu *et al.*, 2000).

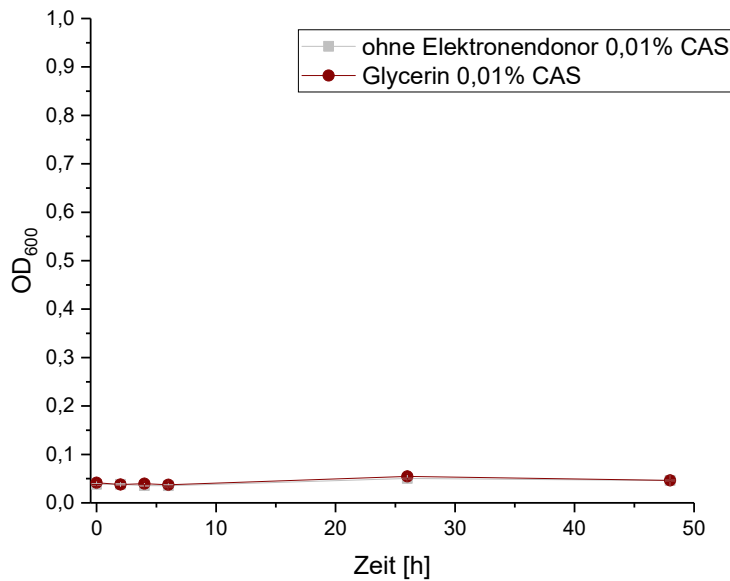


Abbildung 37: Wachstumskurve in PBS-Medium mit Glycerin mit 0,01% Casaminosäuren (CAS) mit dem Stamm *S. oneidensis* mit pBAD-*mgsA-hchA-gpsA-glpF* zeigt kein aerobes Wachstum.

Da auch die Integration dieses weiteren Gens zu keinem Wachstum führte, wurde via Realtime-PCR überprüft, ob alle Gene exprimiert werden. Dazu wurde der Stamm zum einen aerob auf Glycerin und zum anderen anoxisch auf Glycerin/DMSO bzw. Laktat/Fumarat angezogen. Die RNA wurde aus den zusammengenommenen Triplikaten isoliert und anschließend analysiert. Die Expressionsstärken wurden auf das Haushaltsgen *rpoA* bezogen.

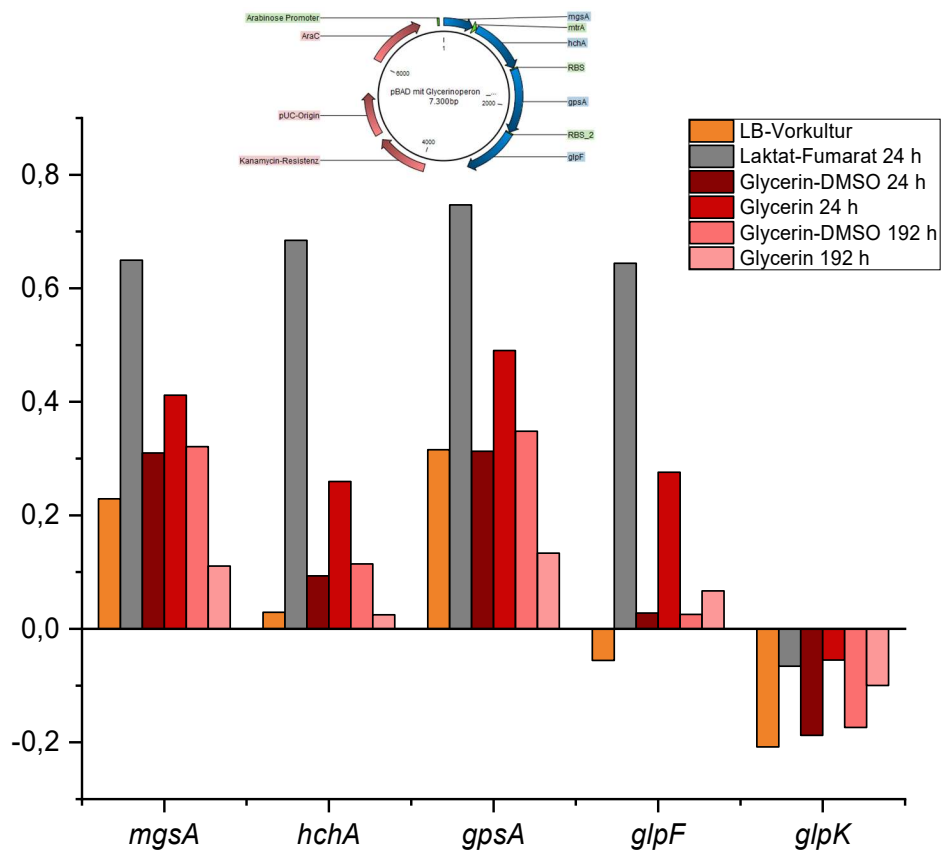


Abbildung 38: Expression der Glyceringene bezogen auf *rpoA*. In orange ist die nicht induzierte Vorkultur gezeigt, in grau die Laktat-Fumarat-Kultur und in den Rottönen die jeweiligen Glycerin-Ansätze. Für die gezeigte Darstellung wurde in der jeweiligen Probe *rpoA* gleich 1 berechnet und das Verhältnis der untersuchten Gene zu *rpoA* berechnet. Anschließend wurden die Unterschiede zu *rpoA* aufgetragen (X_{Gen-1}).

Hierbei zeigte sich, dass die Glycerinkinase geringer exprimiert war als die restlichen Gene. Darum wurde die *S. oneidensis* eigene Glycerinkinase zusätzlich in das Plasmid integriert. Dies erfolgte mittels Restriktionsverdau mit *SpeI*, anschließender Dephosphorylierung und Gibson-Reaktion mit dem *glpK*-Fragment, welches mit den Primern Nr. 28 und 29 hergestellt wurde.

Da eine Wachstumskurve keinen OD-Anstieg verzeichnen ließ, wurde dieser Stamm in einem Zellsuspensionsassay getestet.

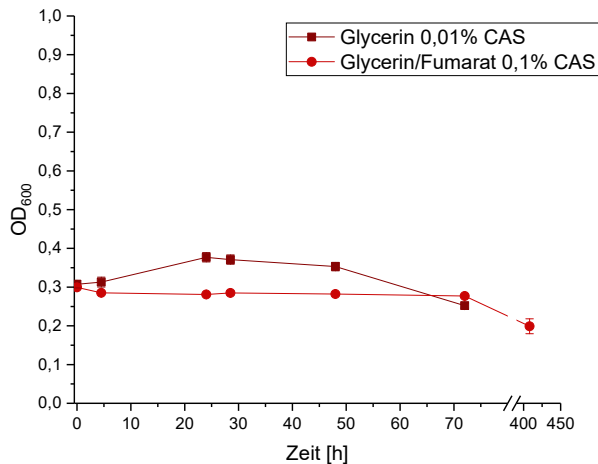


Abbildung 39: Zellsuspensionsassay mit dem Stamm *S. oneidensis* pBAD-*mgsA-hchA-gpsA-glpF-glpK*. Zum einen aerob mit Glycerin und zum anderen mit Glycerin/Fumarat in PBS-Medium. Komplementation mit 0,1 mM Arabinose und 50 µg/ml Kanamycin.

Für den synthetischen Glycerin-Abbaupfad muss zunächst ATP investiert werden, daher war die Überlegung, ob dem Organismus die Energie zum Wachsen fehlt. Darum wurde im nächsten Schritt ein Zellsuspensionsassay angesetzt um die Abnahme von Glycerin über die HPLC zu detektieren und Wachstum nicht als einzigen Indikator für die Funktionalität zu nutzen. Hierbei ließ sich keine Abnahme der Glycerinkonzentration messen, zusätzlich besitzt Fumarat im RI-Detektor die gleiche Retentionszeit wie Glycerin. Deshalb wurde via Glycerol-Free-Reagent ein Glycerin-Nachweis durchgeführt. Auch hier war keine Abnahme von Glycerin nach 408 h im anaeroben und nach 72h im aeroben Ansatz zu erkennen (Abbildung 40).

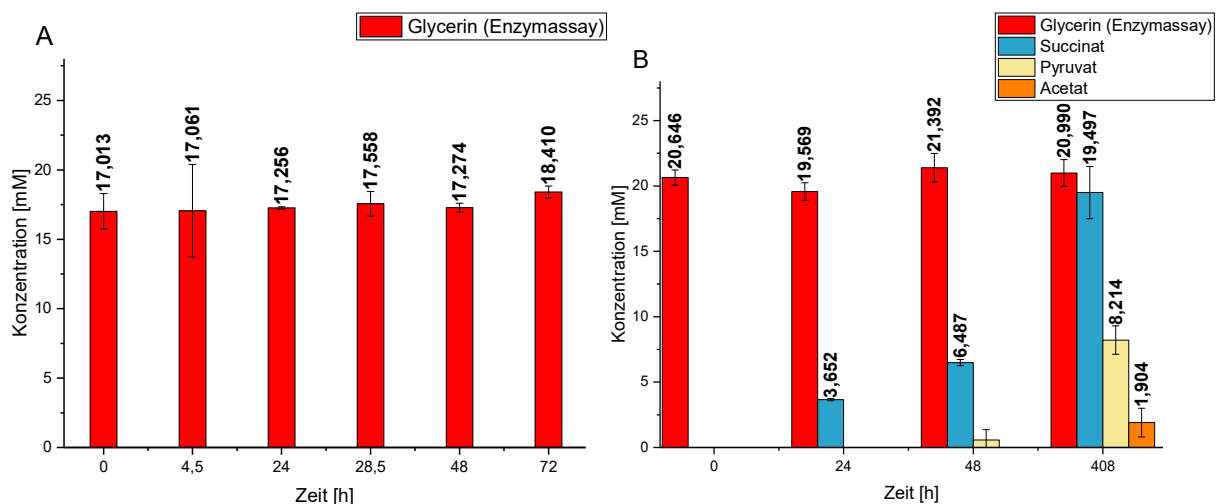


Abbildung 40: Auswertung der Glycerinkonzentration erfolgte über die Glycerol-Free-Reagent und die weitere Analyse mittels HPLC. A: Glycerinkonzentrationen des aeroben Ansatzes mit dem Stamm *S. oneidensis* pBAD-*mgsA-hchA-gpsA-glpF-glpK*. B: Konzentrationen des anaeroben Ansatzes mit dem Stamm *S. oneidensis* pBAD-*mgsA-hchA-gpsA-glpF-glpK*.

Allerdings konnte nach 24h Succinat und nach 408h auch Acetat und Pyruvat nachgewiesen werden. Dies warf die Frage auf, was verstoffwechselt wird, wenn nicht Glycerin als Substrat dient.

Um dies zu untersuchen wurde der Stamm in Glycerin/DMSO und Fumarat-Medium ohne Elektronendonator im Zellsuspensionsassay getestet.

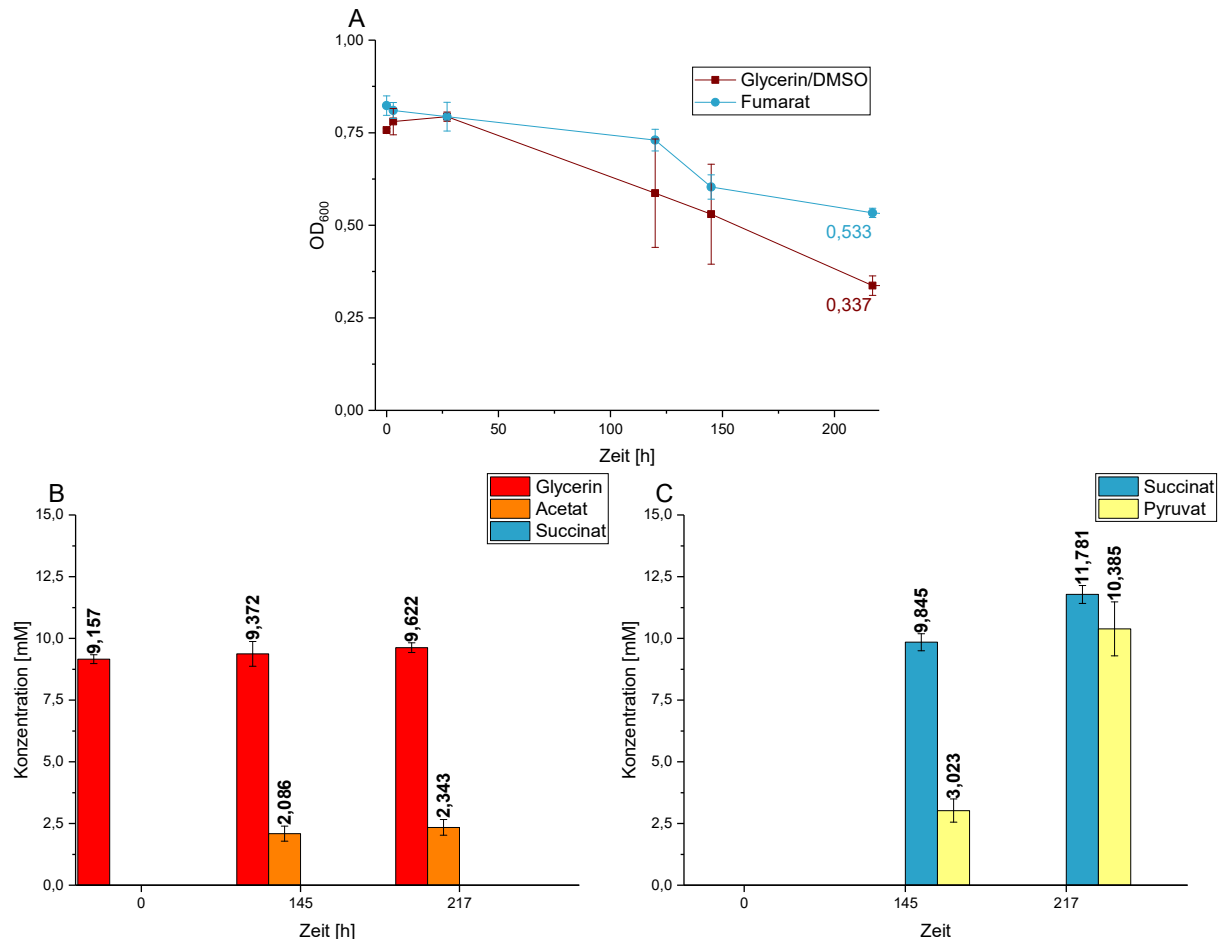


Abbildung 41: Zellsuspensionsassays mit *S. oneidensis* mit pBAD-*mgsA-hchA-gpsA-glpF-glpK*. A: OD-Messung des Zellsuspensionsassays B: HPLC-Daten des Glycerin-DMSO-Ansatz dabei entsteht etwa 2 mM Acetat ohne Glycerinabnahme. B: HPLC-Daten des Fumarat-Mediums ohne Elektronendonator, dabei entstehen etwa 11 mM Succinat und 10 mM Pyruvat.

Die weiteren Zellsuspensionsassays führten ebenfalls zu keiner messbaren Abnahme von Glycerin, aber einem Auftreten von Acetat zu 2 mM. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Fumarat in gewissen Anteilen in Succinat und Pyruvat umgesetzt wird, wenn kein anderer nutzbarer Elektronendonator vorhanden ist.

Zusätzlich wurde überprüft, ob es zu einer Ankonzentration von Methylglyoxal im Medium aufgrund eines nicht vollständig ablaufenden Glycerinabbauwegs kommt. Hierzu wurde Methylglyoxal auf der HPLC aufgetrennt. Es besitzt im RI-Detektor eine Retentionszeit von 11,8. Laut Literatur sind bereits Konzentrationen von etwa 1,2 mM

hemmend für *E. coli* (Rabie *et al.*, 2016). An dieser Stelle konnte allerdings kein HPLC-Signal identifiziert werden, jedoch geringe Mengen an Succinat (Retentionszeit 11,2), die aber unterhalb der detektierbaren Konzentrationen lagen.

4.5 Cellulosestoffwechsel

Neben Glycerin wurde in dieser Arbeit ebenfalls Cellulose als Substrat eingesetzt. In der Arbeitsgruppe wurde in Vorarbeiten eine Cellulase an eine verkürzte Version eines löslichen äußeren Membrancytochroms (MtrF) gekoppelt (Dietrich, 2015). Dies diente dem Nachweis, welche Bereiche von MtrF für den Transport aus der Zelle notwendig sind. Die fusionierte Cellulase ermöglicht den Abbau von Cellulose zu Cellobiose-Untereinheiten. Cellobiose besteht aus zwei β -1,4-glycosidisch verknüpften Glucose-Monomeren. Zum weiteren Abbau der Cellobiose wird daher eine Cellobiase oder auch β -1,4-Glucosidase benötigt. Hierzu wurde *S. oneidensis* mit *Lactococcus lactis* DSMZ 20481 kultiviert. Vorteil dieser Kultivierung ist das *L. lactis* homofermentativ aus Cellobiose Laktat bildet. Laktat wird von *S. oneidensis* genutzt und zu Acetat umgesetzt.

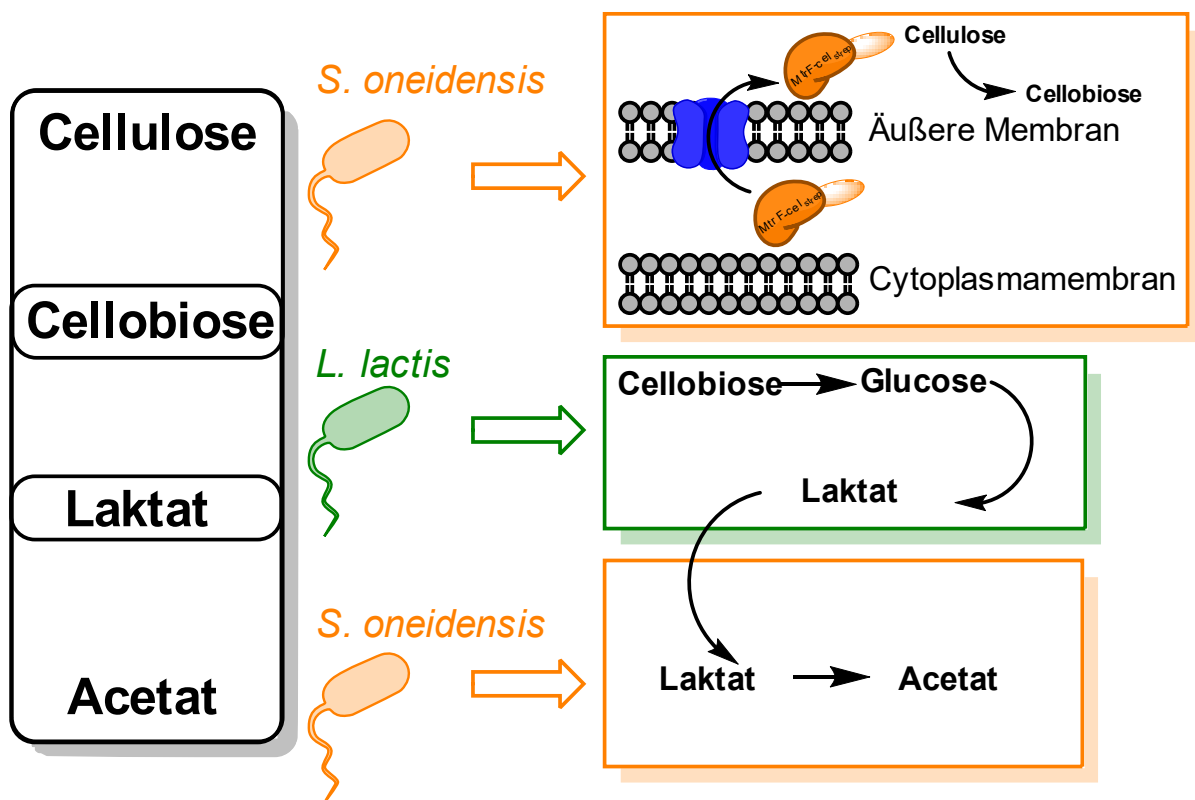


Abbildung 42: Schema der Co-Kultivierung von *S. oneidensis* mit *L. lactis*. Cellulose wird über die freigesetzte Cellulase zu Cellobiose umgesetzt. Diese wird anschließend von *L. lactis* über Glucose zu Laktat verstoffwechselt. Laktat wird von *S. oneidensis* genutzt und zu Acetat umgesetzt.

Zunächst wurde in einem angepassten M4-Medium getestet, Welche Wachstumscharakteristika *L. lactis* in verschiedenen Minimalmedien aufweist.

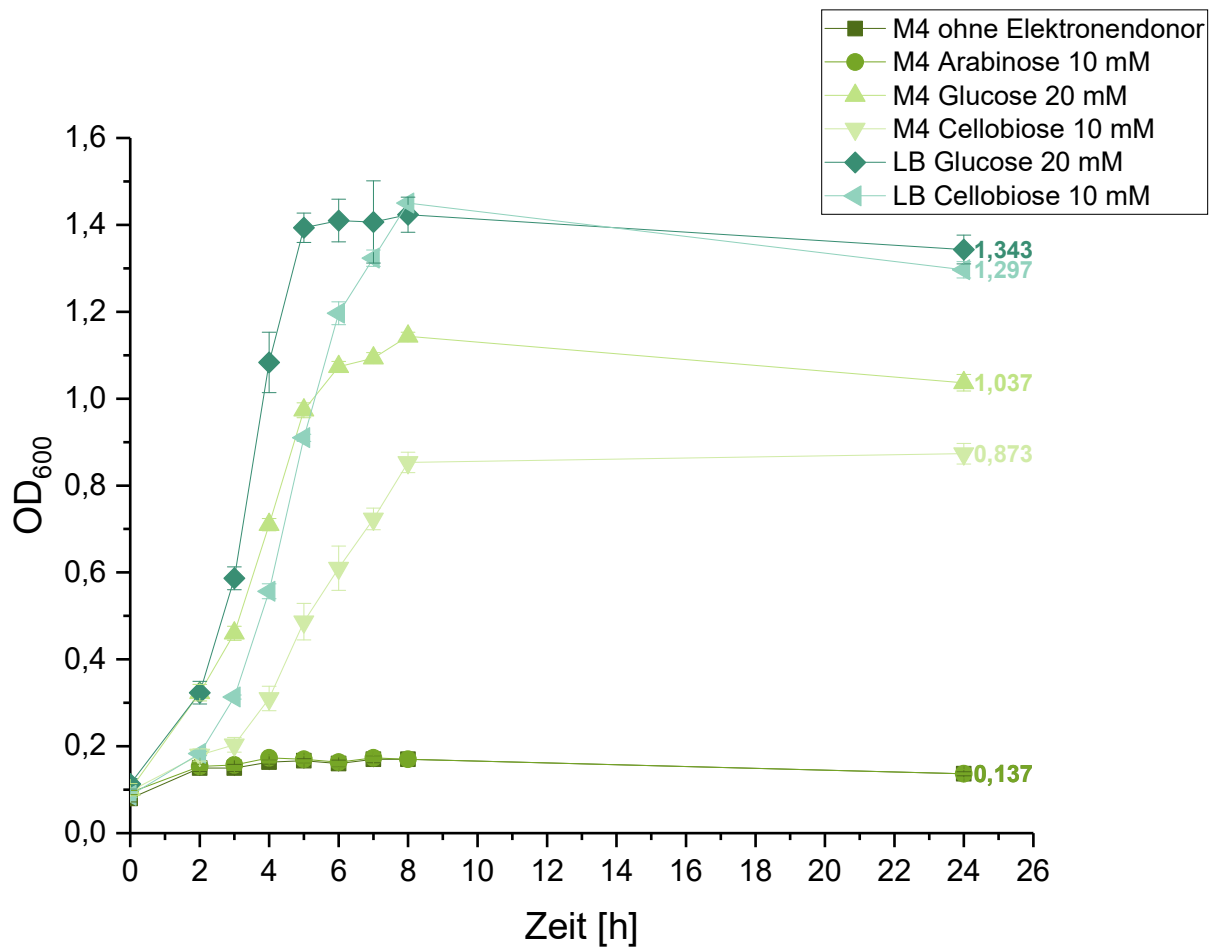


Abbildung 43: Wachstumskurve mit *L. lactis* mit verschiedenen Elektronendonoren zum einen in LB und zum anderen in M4-Medium.

Es zeigt sich das *L. lactis*, sowohl in LB als auch M4-Medium, mit Glucose bzw. Cellobiose wachsen kann. Arabinose wurde getestet, da es als Induktor in den weiteren Versuchen eingesetzt wurde. In diesem Medium wurde kein Wachstum detektiert.

Im Weiteren wurde *L. lactis* gemeinsam mit vier verschiedenen *S. oneidensis*-Stämmen mit Carboxymethylcellulose als Substrat inkubiert. Die Zugabe von 5 mM Laktat sollte die initiale Cellulaseproduktion ermöglichen.

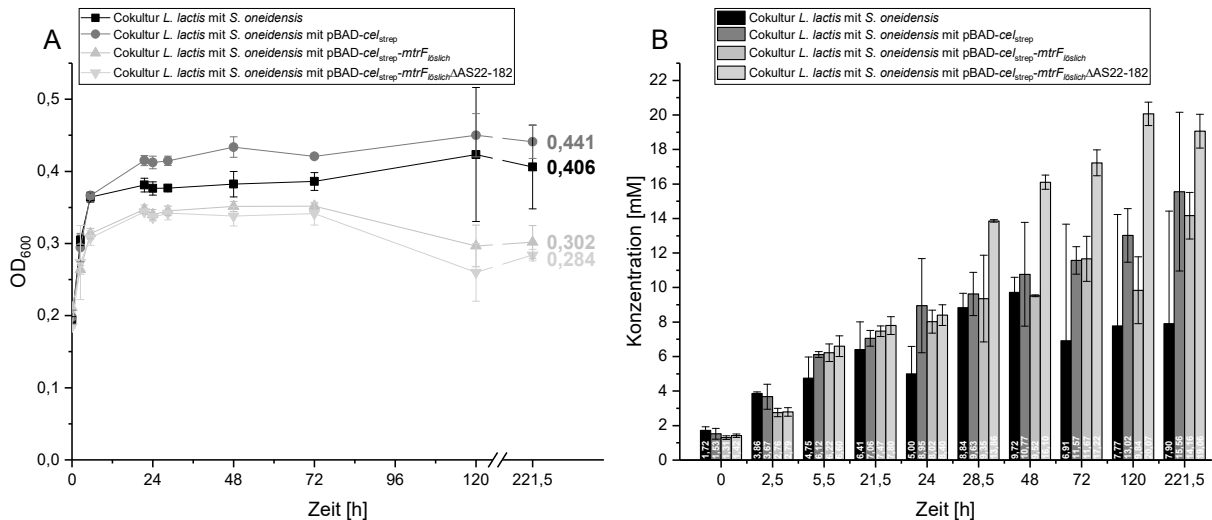


Abbildung 44: Wachstumskurve mit *L. lactis* und vier verschiedenen *S. oneidensis*-Stämmen. In schwarz (Rechteck) ist der Versuch mit *S. oneidensis* MR-1, in dunkelgrau (Kreis) mit *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}, in hellgrau (Dreieck nach oben) *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}-*mtrF*_{löslich} und in hellgrau (Dreieck nach unten) *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}-*mtrF*_{löslich}ΔAS22-182 dargestellt. Die beiden Stämme wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit einer jeweiligen StartOD von 0,1 eingesetzt und in M4-Medium mit Hefe, Laktat und CMC inokuliert. Es wurde kein Kanamycin zugegeben, aber 0,2 mM Arabinose zur Induktion. A: OD der Wachstumskurve über 221,5h. B: Acetatauswertung via Enzymtest, da die Lösung zu viskös für eine HPLC-Messung war.

L. lactis wurde mit den vier verschiedenen *S. oneidensis*-Stämmen *S. oneidensis* MR-1, *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}, *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}-*mtrF*_{löslich} und *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}-*mtrF*_{löslich}ΔAS22-182 kultiviert. Als Negativkontrollen dienten hierbei die Ansätze mit dem Wildtyp (*S. oneidensis* MR-1) und *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}. In diesen Ansätzen kann die Cellulase nicht über die Membran nach außen transportiert werden, um die Cellulose zu zersetzen. Durch die Kopplung an das äußere Membran Protein MtrF wird der *S. oneidensis*-Transportmechanismus für äußere Proteine genutzt. Es wurden zweierlei Versionen getestet zum einen das vollständige MtrF-Protein und zum anderen eine verkürzte Version, bei der die Aminosäuren 22-182 deletiert wurden (Dietrich, 2015). Bei beiden MtrF-Versionen handelt es sich um lösliche Varianten, da der Lipidanker ebenfalls entfernt wurde.

Hierbei zeigte sich eine Zunahme der OD₆₀₀ von 0,2 auf 0,441 und 0,406 der beiden Negativkontrollen. Die beiden Ansätze mit der löslichen Cellulase zeigten einen Anstieg auf 0,302 und 0,284. Um eine Aussage über die Umsetzung von Cellulose nachweisen zu können, wurde mittels Acetat-Enzymtest die Acetatkonzentration bestimmt. Da ebenfalls 5 mM Laktat im Medium vorhanden war, wurden auch in den Negativkontrollen Acetat nachgewiesen. Die Ansätze mit dem Wildtyp zeigten eine Endkonzentration von 7,9 mM Acetat. Während die Co-Kultivierung mit *S. oneidensis*

mit pBAD-*cel*_{strep} eine Acetatkonzentration von 15,6 mM aufwies. Im Ansatz mit *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}-*mtrF*_{löslich} konnte eine Konzentration von 14,2 mM Acetat nachgewiesen werden und mit *S. oneidensis* mit pBAD-*cel*_{strep}-*mtrF*_{löslich}ΔAS22-182 eine Acetatkonzentration von 19,1 mM. Somit konnte in einem ersten Ansatz gezeigt werden, dass die Umsetzung von Cellulose zu Acetat möglich war. Die Medien zeigten ebenfalls eine Veränderung der Viskosität. In den Ansätzen mit Cellulase wurden die Medien deutlich flüssiger.

Zum weiteren Vereinfachen der Handhabung sollte *S. oneidensis* ohne die Cokultivierung in der Lage sein, Cellulose umzusetzen, hierzu wurde aus *L. lactis* die Cellobiase mit den Primern Nr. 44 und 43 amplifiziert und in einen pBAD-Vektor kloniert. In Wachstumskurven wurde zunächst mit dem Wildtyp auf OD₆₀₀-Zunahme getestet. Die Kulturen wurden mit 0,1 mM Arabinose induziert und es wurde zu jeder Kultur mit pBAD-Plasmid 50 µg/ml Kanamycin zugegeben. Durch die Erfahrungen aus den Glycerin-Wachstumskurven wurde in diesem Versuchsteil die Konzentration der Casamino­säuren zu Beginn auf 0,01% gesetzt.

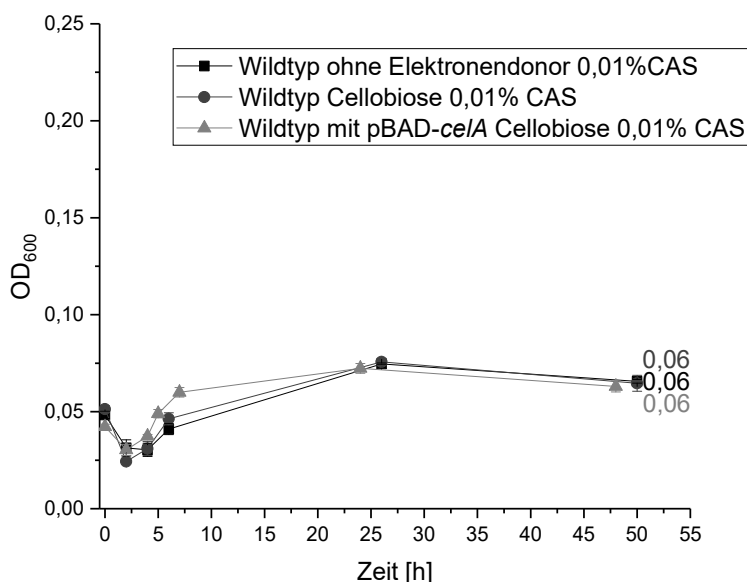


Abbildung 45: Wachstumskurve des Wildtyps auf Cellobiose und ohne Elektronendonator als Kontrolle und Wildtyp mit pBAD-*ce/A* auf Cellobiose. Das Medium wurde mit 0,1 mM Arabinose und Kanamycin 50µg/ml komplementiert.

Sowohl der Wildtyp als auch der Wildtyp mit der Cellobiase zeigten kein Wachstum auf Cellobiose. Da *S. oneidensis* nur nach Adaption an Glucose, Glucose als Substrat nutzen kann, ist dies gegebenenfalls auch eine Hinderung beim Umsetzen von Cellobiose. Cellobiose wird durch die Cellobiase in Glucose und Glucose-Phosphat

gespalten. Um diese Limitierung zu umgehen wurde der Wildtyp Glucose adaptiert. In Abbildung 46 ist der theoretische Abbauweg schematisch dargestellt.

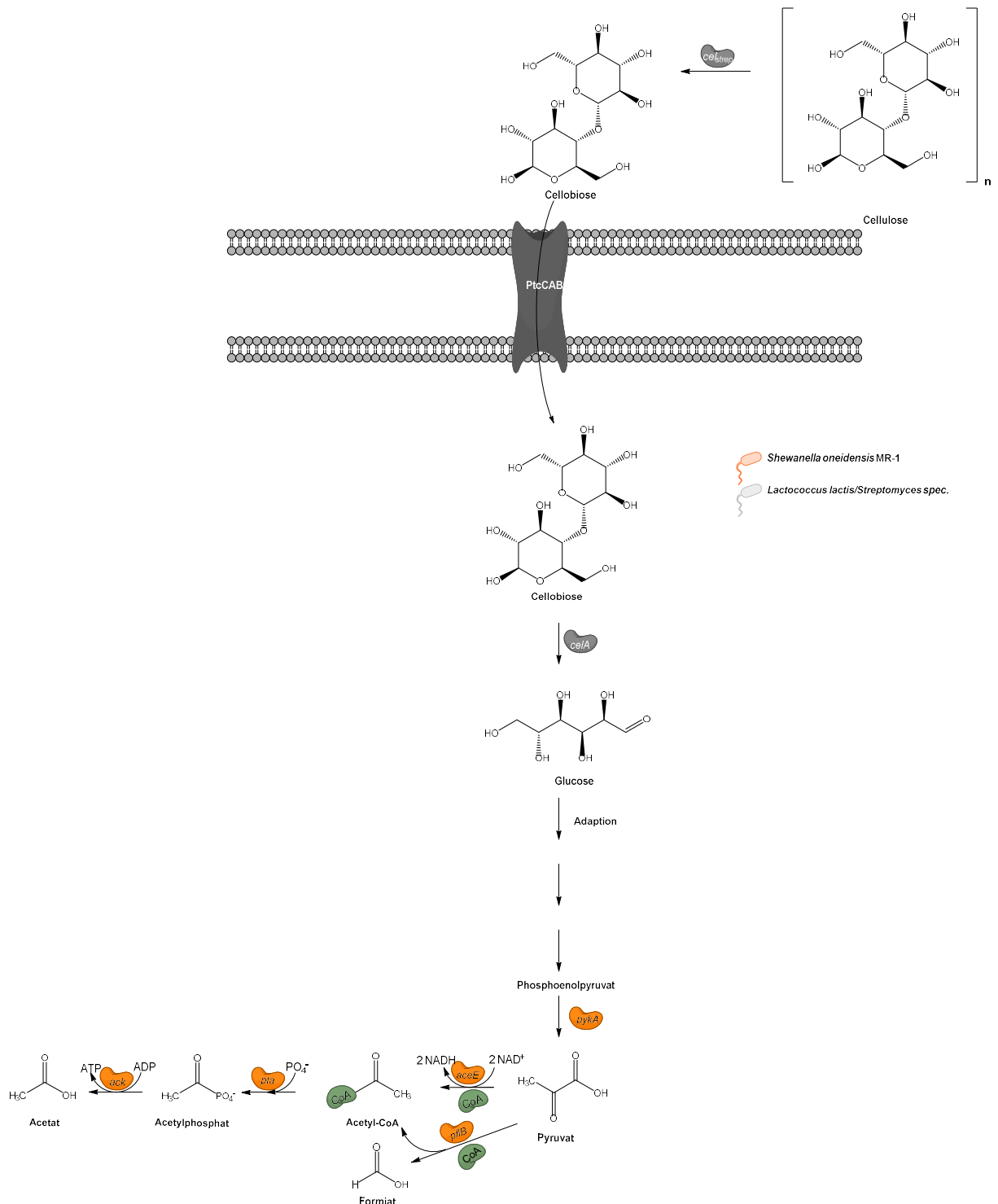


Abbildung 46: Potentieller Cellulose-Abbauweg in *S. oneidensis* über die Integration des Cellobiose-Operons von *L. lactis* und der Cellulase aus *Streptomyces spec.*

Für die Glucoseadaption wurde *S. oneidensis* viermal in neues Glucose-Minimalmedium (PBS) überführt und anschließend auf Glucose-Minimalmedium-Platten ausplattiert. Eine gewachsene Einzelkolonie wurde

erneut in Minimalmedium (PBS mit Glucose) überführt und anschließend als Cryostock konserviert. In allen weiteren Schritten wurde der Stamm stets in Glucose-PBS-Medium angezogen oder ausplattiert auch nach der Transformation mit pBAD-ce/A.

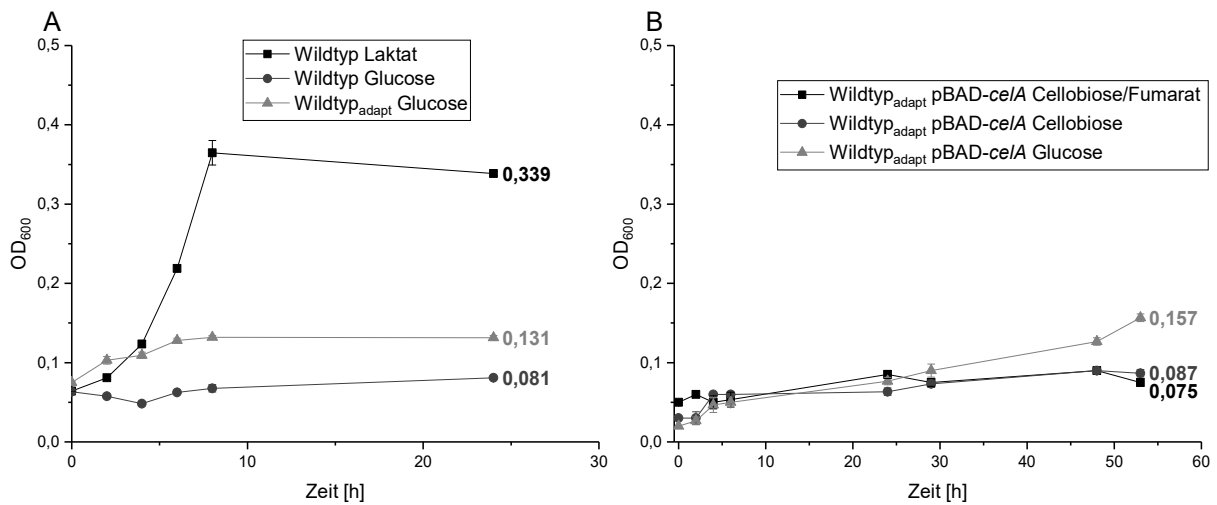


Abbildung 47: Wachstumskurve in PBS-Medium mit 0,01% Casaminosäuren und Cellobiose (10 mM) oder Glucose (20mM) als Elektronendonator. A: *S. oneidensis* Wildtyp und adaptierten Stämmen B: *S. oneidensis* an Glucose adaptiert mit pBAD-ce/A. In diesen Ansätzen wurde 0,1 mM Arabinose und Kanamycin 50 µg/ml komplementiert.

Der Wildtyp wächst unter oxischen Bedingungen in 8h mit Laktat von OD 0,064 auf 0,36. Der Wildtyp auf Glucose zeigt kein Wachstum in 24h, während der adaptierte Stamm von 0,075 auf eine OD von 0,13 wächst. Der Glucose adaptierte Stamm mit pBAD-ce/A mit einer StartOD von 0,02 wächst in 53 Stunden auf OD 0,157. Während kein Wachstum auf Cellobiose, weder aerob noch anaerob, zu verzeichnen ist.

Gründe für das fehlende Wachstum könnten der Cellobiose-Transport oder der Induktionsstärke sein. *S. oneidensis* besitzt einen annotierten Transporter Crr für den Transport von Glucose, Galactose und Cellobiose (BioCyc). Zusätzlich wurde der *Lactococcus* eigene Cellobiose-Transporter PtrABC mit den Primern Nr. 42 und 45 versucht auf ein pBAD-Plasmid zu integrieren. Da eine fehlende Funktionalität des *Shewanella*-eigenen Transporters angenommen wurde. Diese Klonierung steht zum aktuellen Zeitpunkt noch aus.

In einem weiteren Ansatz wurde der Glucose-adaptierte Stamm mit pBAD-ce/A mit einer höheren Induktionsstufe in einem Wachstumsversuch kultiviert. Hierbei wurden zum einen 10 mM Glucose und 10 mM Cellobiose zum oxischen PBS-Medium hinzugegeben. Die Start-OD war 0,015 die Induktion erfolgte mit 1 mM Arabinose. Für den Erhalt des Plasmids wurde 50 µg/ml Kanamycin zugegeben (Abbildung 48).

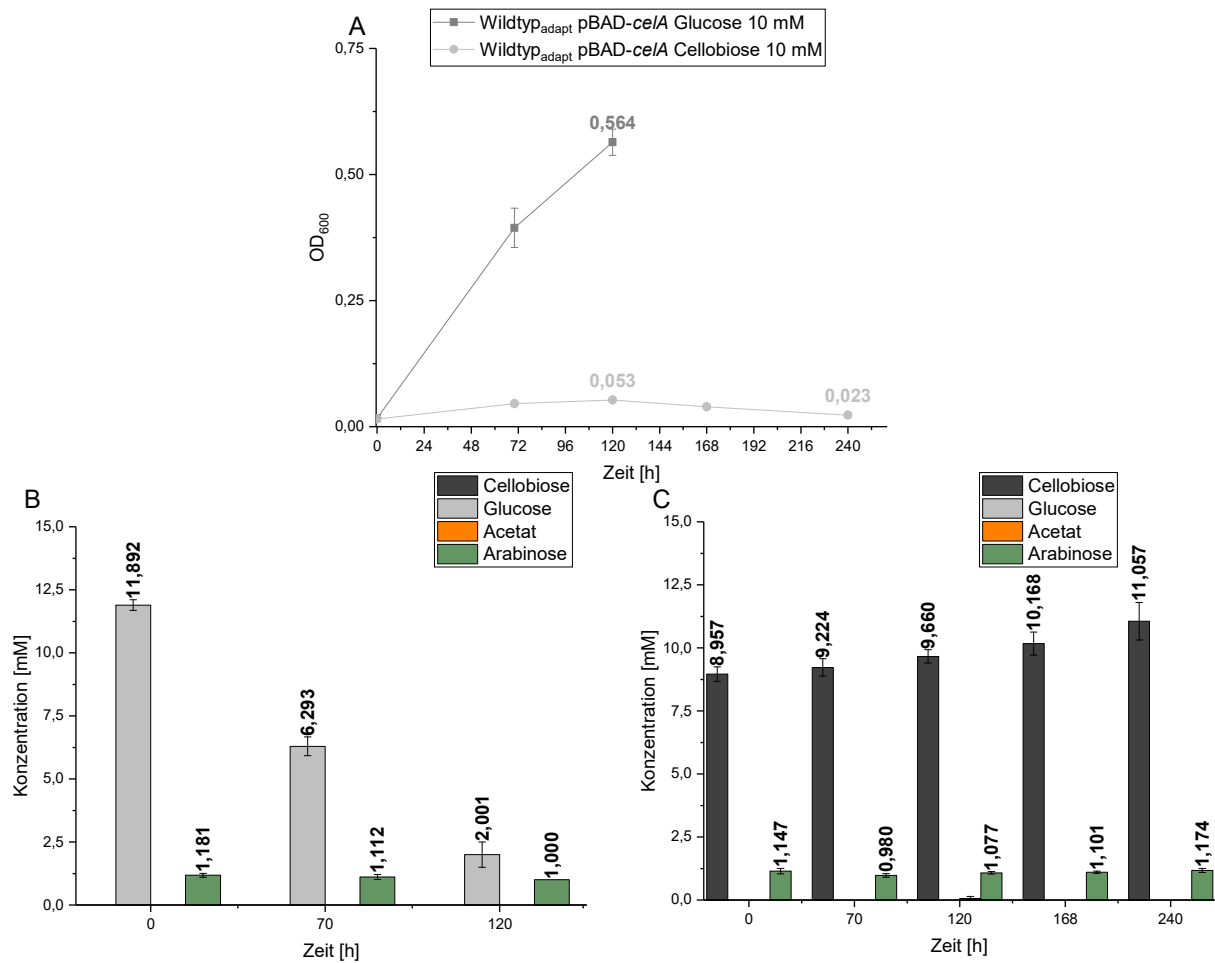


Abbildung 48: Wachstumskurve und HPLC-Daten von dem an Glucose-adaptierten *S. oneidensis* Wildtyp mit pBAD-ceiA. Arabinose wurde als Induktor in einer Konzentration von 1 mM zugegeben und Kanamycin 50 µg/ml für den Erhalt des Plasmids. A: Wachstumskurve über 120 bzw. 240h. B: HPLC-Daten zur Wachstumskurve mit Glucose. C: HPLC-Daten zur Wachstumskurve mit Cellobiose.

In 120 Stunden ist die OD von 0,015 auf 0,564 im Ansatz mit Glucose gestiegen, während im Ansatz mit Cellobiose ein Anstieg auf 0,053 zu verzeichnen ist.

In 70h wurde etwa die Hälfte der Glucose verstoffwechselt und nach zusätzlichen 50h weitere 4 mM Glucose. Die Cellobiose-Ansätze wiesen im Anfangswert eine Cellobiosekonzentration von etwa 9 mM auf. Es wurde über die HPLC keine Abnahme des Substrats gemessen und auch kein Entstehen anderer Substanzen detektiert.

5 Diskussion

5.1 Elektrodenperformance

Unter Stressbedingungen wie UV-Licht-Exposition oder Nahrungsmangel induzieren Phagen die Zelllyse. Die Deletion von Phagen sollte daher zu einer stabileren *S. oneidensis*-Kultur unter Stressbedingungen führen. Während die Deletion des λ -Phagen zu einer Stromsteigerung von 1,34 und einer erhöhten Zellzahl auf der Anodenoberfläche im Vergleich zum Wildtyp führte, sind bei den weiteren Deletionen der Prophagen keine weiteren Leistungs- und Zellzahlsteigerungen zu verzeichnen gewesen. Gödeke *et al.* (2011) beschreiben, dass die Deletionen der Phagen zu einer verminderten Biofilmbildung führt, hierbei scheint der λ -Phage den größten Beitrag zu leisten (Gödeke *et al.*, 2011). Die Autoren zeigen zusätzlich, dass zumindest der λ -Phage und MuSo2-Phage zu Zelllyse führen können (Gödeke *et al.*, 2011). Durch Zelllyse wird DNA frei (eDNA), welche der Adhäsion zwischen den Zellen und als Biofilmsubstratum dienen kann. Es gibt allerdings auch weitere extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) wie diverse Zucker und Proteine die ebenfalls Biofilmbildung unterstützen können (Vu *et al.*, 2009; Gödeke *et al.*, 2011).

Somit ist davon auszugehen, dass die einzelne Deletion des λ -Phagen zu einer Erhöhung der Stabilität der Kultur führt, welche in höher messbaren Stromdichten zu sehen war. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass mit der schrittweisen Deletion die Stromproduktion nicht über das $\Delta\lambda$ -Niveau erhöht werden konnte und mit keiner verbesserten Anheftung auf der Anode einherzugehen scheint. Somit ist zu spekulieren, dass mit der Deletion des λ -Phagen das richtige Maß an Stabilität der Zellkultur mit Anodenanheftung noch möglich ist. Während bei weiteren Deletionen die Anheftung aufgrund fehlender Biofilmkomponenten verringert wird und die Stabilität der Kultur keinen weiteren Einfluss auf die Stromproduktion besitzt. Im Falle der λ -Mutante könnten auch durch die geringere Zelllyse eine bessere Elektrodenperformance gezeigt werden, da weniger Zelllyse-Produkte die Elektrodenoberfläche blockieren könnten. Da die weiteren Deletionen nicht die erhoffte erhöhte Stromproduktion zeigten, wurde im Weiteren nur mit der Einzelmutante weitergearbeitet.

5.2 Metabolic Engineering

Da *S. oneidensis* nur ein eingeschränktes Substratspektrum besitzt, wurden in dieser Arbeit zwei weitere Substrate versucht dem Modellorganismus zugänglich zu machen. Hierbei wurden zwei Substrate gewählt, die als billige Rohstoffe gelten.

5.2.1 Cellulosestoffwechsel

Cellulose ist als nachwachsende Ressource bereits Mittelpunkt vieler Arbeiten. Um *S. oneidensis* nun den Abbau dieses schwerlöslichen Polysaccharids zu ermöglichen, wurde der Stamm genetisch modifiziert. Hierbei führte die Integration einer Endocellulase von *Streptomyces spec.* (Cel_{strep}) wie in Vorarbeiten gezeigt zu der Fähigkeit Carboxymethylcellulose (CMC) zu Cellobiose umzusetzen (Dietrich, 2015; Edel, 2018). CMC ist eine in Wasser lösliche Variante von Cellulose und konnte so in Versuchsansätzen in definierten Mengen hinzugegeben werden. Für den Transport der Cellulase aus *S. oneidensis* wurde sie an eine lösliche Version des äußeren Membranproteins MtrF gekoppelt (Dietrich, 2015). In weiteren Vorarbeiten wurden verschiedene Bereiche von MtrF deletiert um herauszufinden, welche Domänen für den Transport über die Membran notwendig sind (Dietrich, 2015). In dieser Arbeit wurde neben dem Stamm mit $pBAD-cel_{strep-mtrF_{löslich}}$ (JG 1016) auch der Stamm mit dem Plasmid $pBAD-cel_{strep-mtrF_{löslich}}\Delta AS22-182$ (JG 1018) verwendet. Hierbei ist die Cellulase jeweils an den N-Terminus des Cytochroms gekoppelt.

Der Stamm JG 1018 zeigte in den gezeigten Co-Kultivierungen die höchste Acetatproduktion mit 19,06 mM. Der Stamm mit dem Plasmid $pBAD-cel_{strep-mtrF_{löslich}}$ (JG 1016) zeigte mit 14,16 mM Acetat eine geringere Produktion. Dies ist vermutlich dem Aufwand geschuldet, ein größeres Protein zu synthetisieren bzw. dieses aus der Zelle zu schleusen. Zudem wird immer häufiger diskutiert, dass die Expression von zusätzlichen oder organismenfremden Genen, den genutzten Organismus in metabolischen Prozessen beeinträchtigen, was zu Produktionseinbußen führen kann (Glick, 1995; Wu *et al.*, 2016).

In dieser Co-Kultivierung wurden zusätzlich zwei Negativkontrollen durchgeführt mit einem Stamm, der eine unlösliche Cellulase exprimiert und dem Wildtyp. Die Co-Kultivierung des Stammes mit $pBAD-cel_{strep}$ (JG 1015) zeigte eine Acetatkonzentration von 15,56 mM und auch die Kultivierung mit dem Wildtyp zeigte eine messbare Acetatproduktion von 7,9 mM. Dem Medium wurde 5 mM Laktat

zugesetzt um die initiale Enzymproduktion für den Celluloseabbau zu ermöglichen. Die hohe Acetatausbeute durch die ungekoppelte Cellulase ist vermutlich Zelllyse geschuldet und damit einer Freisetzung der Cellulase in das Medium.

Nach den erfolgreichen Vorversuchen in der Co-Kultivierung mit *Lactococcus lactis* DSM 20841 wurde nach einer Möglichkeit gesucht *S. oneidensis* ohne Co-Kultivierung Cellulose zugänglich zu machen.

Hierzu wurde die Cellobiase aus *L. lactis* zunächst über ein pBAD-Plasmid eingefügt. Sowohl *S. oneidensis* als auch dessen Glucose-adaptierte Version zeigten kein Wachstum auf Cellobiose unter oxidischen oder anoxischen Konditionen. Laut BioCyc ist der in der Cytoplasma-Membran lokalisierte Transporter Crr auch für den Transport von Cellobiose zuständig. Rodionov *et al.* (2010) verweisen im Vergleich von mehreren *Shewanella*-Genomen auf *ptsHI-crr* und *ptsG*, welches zum *E. coli* PTS^{Glc} homolog ist (Rodionov *et al.*, 2010). Die Bezeichnung bei UniProt lautet ebenfalls Phosphotransferase-System (PTS) Glucose-spezifische IIA Komponente Crr für *S. oneidensis*. Dennoch ist dieser Transporter vermutlich nicht funktionell.

Um eine Aufnahme von Cellobiose zu ermöglichen, sollte in weiteren Arbeiten der *L. lactis*-Transporter PtrABC integriert werden, um eine Aufnahme zu ermöglichen. Als weitere Möglichkeit bietet sich an, die Cellobiase CelA an das lösliche äußere Membran Cytochrom MtrF^{löslich} in einer vergleichbaren Weise zur Cellulase Cel^{strep} zu koppeln. Dies würde den Transport der Cellobiase über die Membran ermöglichen. Außerhalb der Zelle würde so Cellulose zu Glucose über die beiden Enzyme Cel^{strep} und CelA abgebaut werden. Der Glucose-adaptierte Stamm wäre dann in der Lage Glucose zu verstoffwechseln. Der potentielle Weg ist in Abbildung 46 dargestellt. Durch den Verlust von NagR, während der Adaption von *S. oneidensis* an Glucose, wird das Nag-Operon für den Abbau des Glucose-Analogons N-Acetylglucosamin konstitutiv exprimiert, wodurch Glucose aerob umgesetzt werden kann (Chubiz and Marx, 2017). Chubiz *et al.* (2017) wiesen nach, dass hierfür der NAG-Transporter (NagP) und die NAG-Kinase (NagK) benötigt werden. Diese Enzyme ermöglichen die Aufnahme und Phosphorylierung von Glucose. Über eine C¹³-Analyse konnte die Umsetzung von Glucose über den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg (ED) gezeigt werden (Chubiz and Marx, 2017).

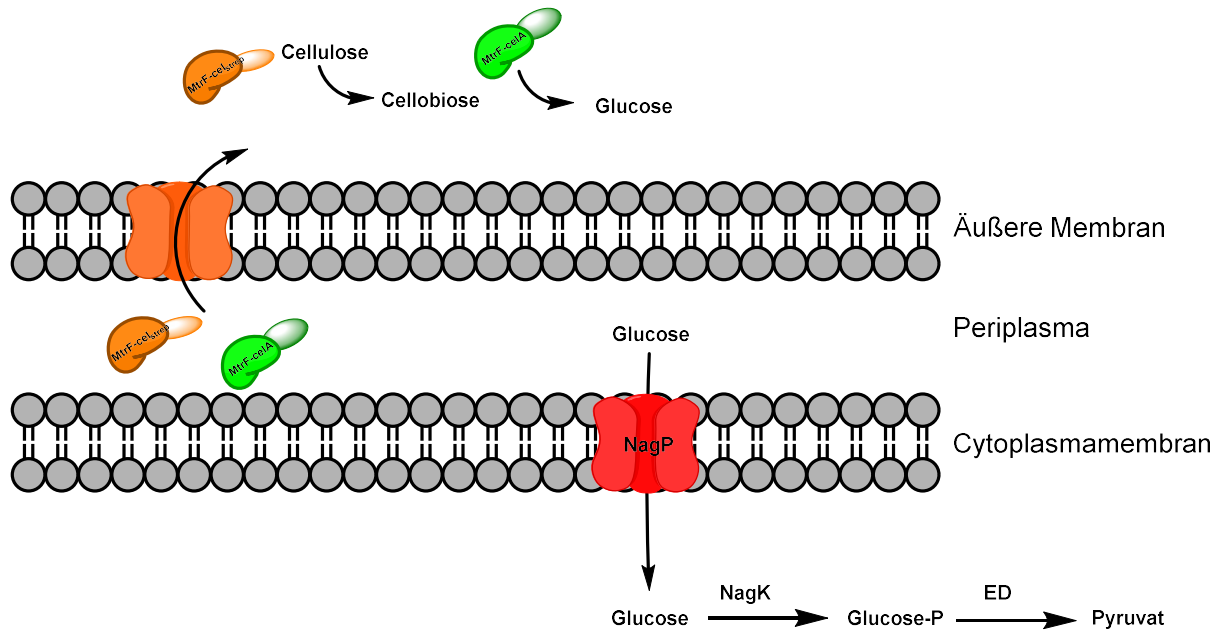


Abbildung 49: Potentieller Abbauweg von Cellulose über lösliche Cellulase und Cellobiase. Hierbei soll Cellulose außerhalb der Zelle zu Cellobiose umgesetzt werden. Die Cellobiase wandelt Cellobiose in Glucose um. Nach der Adaption von *S. oneidensis* an Glucose ermöglicht der Transporter NagP die Aufnahme von Glucose in das Cytoplasma. Die Kinase NagK ermöglicht das Einspeisen von Glucose-P in den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg (ED) und damit die Produktion von Pyruvat bzw. Acetat.

5.2.2 Glycerinstoffwechsel

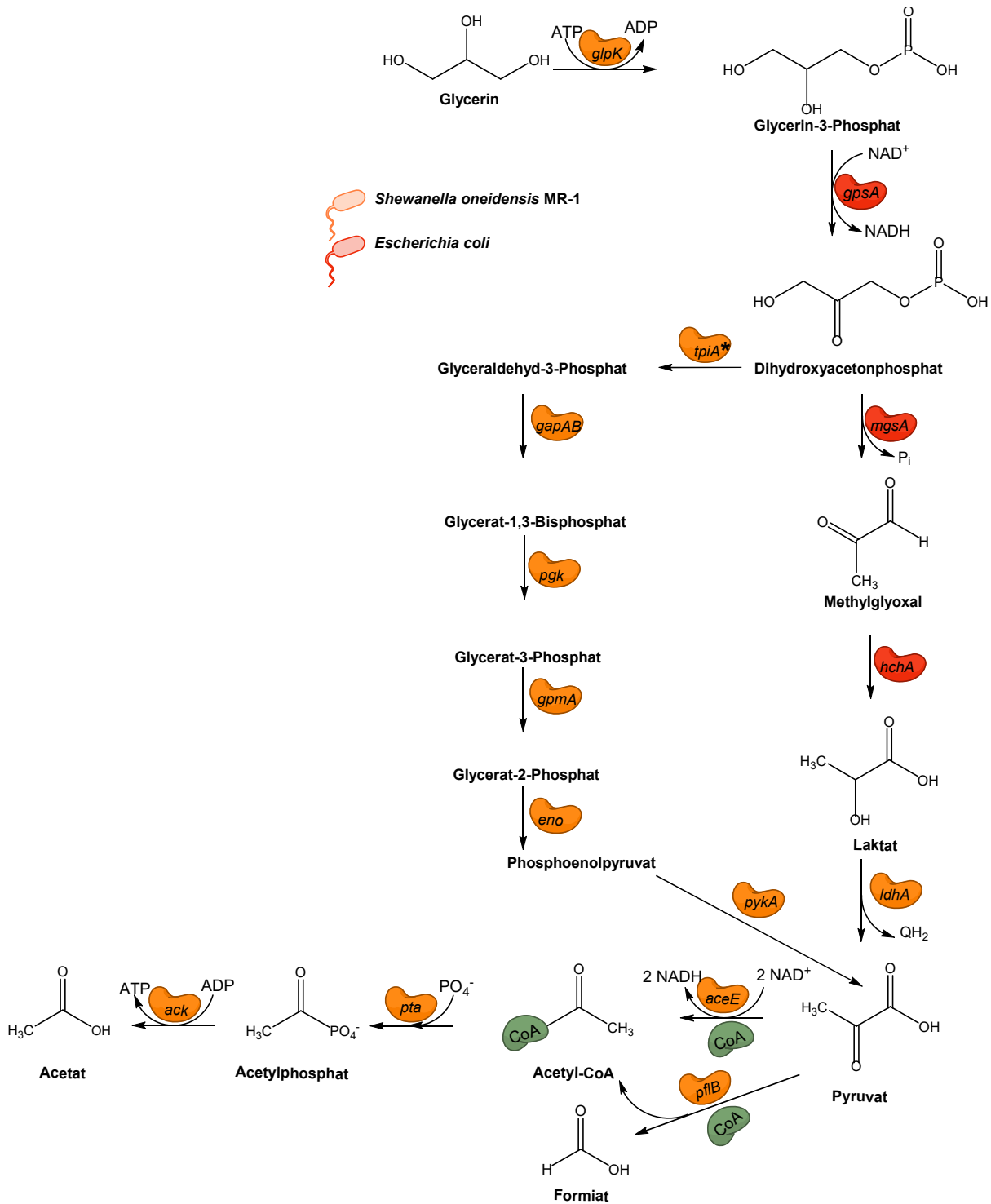
Als weiteres Substrat sollte Glycerin verwertbar gemacht werden. Hierfür wurde ein neuer Stoffwechselweg konzipiert, bestehend aus einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GpsA), einer Cofaktor-freien Glyoxalase III (HchA), einer Methylglyoxalsynthase (MgsA) und dem Glycerin-Transporter (GlpF) aus *E. coli* (Abbildung 50). Auf dem pBAD-Plasmid befanden sich damit die Gene unter der Regulation eines Arabinose-induzierbaren Promoters in der Reihenfolge: *mgsA*, *hchA*, *gpsA* und *glpF*. Dies entspricht nicht der Reihenfolge in der sie im Stoffwechselweg an der Reihe wären. Die Anordnung erfolgte mit der Idee durch die Expression des Gens für die Methylglyoxalsynthase den Druck auf die Zellen zu erhöhen und eine schnellere Glycerin-Umsetzung zu erzielen. Allerdings konnte mit diesem Plasmid keine Glycerinabnahme detektiert werden. Es wurde der Stamm in verschiedenen Medien kultiviert und anschließend die RNA isoliert um eine Aussage über die Expressionslevel der Gene treffen zu können. Da bei den Kultivierungen mit Glycerin kaum bis kein Wachstum detektierbar war. Wird im Weiteren auf die Laktat-Fumarat-Kultur eingegangen. Die Gene die auf dem Plasmid lokalisiert sind, wurden durch die Induktion mit Arabinose in vergleichbaren Expressionsleveln nachgewiesen, während die *S. oneidensis* eigene Glycerinkinase geringer exprimiert wurde. Dies kann in diesem Fall auch auf das Fehlen von Glycerin begründet sein. Da aber auch in allen

anderen Proben dieses Gen geringer exprimiert wurde im Vergleich zu *rpoA* ist dieses Enzym vielleicht der Grund für die fehlende Funktion des Glycerinstoffwechsels. Darum wurde das Gen *glpK* aus *S. oneidensis* zusätzlich auf dem pBAD-Plasmid mit den Genen *mgsA*, *hchA*, *gpsA* und *glpF* integriert. Diese Integration führte ebenfalls zu keinem detektierbarem Wachstum und keiner Glycerinabnahme.

Um *S. oneidensis* die Produktion der Enzyme und des Transporters zu erleichtern, wurden die Zellen in einem weiteren Ansatz vorinduziert. Hierbei sollte bei Beginn der Wachstumskurve bzw. des Zellsuspensionsassays die benötigten Glycerinabbau-Enzyme zur Verfügung stehen. Dies wurde mit einem Acetoin-produzierenden Stamm durchgeführt ($\Delta\lambda::alsSD$ mit pBAD-*mgsA-gpsA-hchA-glpF-glpK*). Doch auch hier konnte keine Glycerinabnahme nach 144h nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit für die fehlende Verstoffwechslung von Glycerin kann neben der Energiebilanz auch die Funktionalität der Enzyme sein. So könnte der Stoffwechselweg auf einer bestimmten Zwischenstufe ins Stocken geraten und die Zellen vergiften. Dies kann beispielweise durch Methylglyoxal geschehen. Die Funktionalität der Enzyme könnte mittels eines Proteinassays geklärt werden, in dem die Zellen via FrenchPress aufgeschlossen werden und anschließend Glycerin-3-Phosphat als Substrat in einer NAD^+ enthaltenen Pufferlösung zugeben wird. So kann über die Reduktion von NAD^+ zu $NADH$ die Funktionalität dieser Komponente getestet werden. Des Weiteren könnte Methylglyoxal als Substrat zugegeben und die Laktatkonzentration im Zelllysate bestimmt werden.

Wie in Abbildung 50 dargestellt, kann auch laut KEGG-Analyse ein anderer Weg durchlaufen werden. Flynn et al. (2010) zeigten das über die Integration einer weiteren Triose-Isomerase, dass die Umsetzung von Glycerin zu Ethanol gesteigert werden kann (Flynn et al., 2010). Das Enzym ist in Abbildung 50 mit einem Stern gekennzeichnet. So könnte in weiteren Arbeiten der Abbau über die zusätzliche Integration einer Triose-Isomerase ermöglicht werden.



5.2.3 Acetoin- und Butandiolstoffwechsel

Die Acetoin- bzw. Butandiolproduktion in *S. oneidensis* wurden zum einen über die Plasmide pBAD-*alsSD*, pBAD-*budC* und pBAD-*budC-alsSD* erreicht und zum anderen über die genomische Integration der jeweiligen Gene mit einem Arabinose-Promoter. Die Induktionsstärke bei Plasmiden betrug 0,1 mM und bei genomisch integrierten

Genen 5 mM Arabinose um eine vergleichbare Produktion von Acetoin und Butandiol zu erzielen.

Für die Produktion von einem Mol Butandiol oder Acetoin müssen zwei Mol Laktat eingesetzt werden. Unter anoxischen Bedingungen bildet *S. oneidensis* aus einem Mol Laktat ein Mol Acetat und generiert dabei ATP.

Mit dem Stamm JG 992 ($\Delta\lambda$ mit pBAD-*alsSD*) wurden maximale Ausbeuten von $106,67 \pm 10,18\%$ Acetoin und mit dem Stamm JG 998 ($\Delta\lambda$ mit pBAD-*budC-alsSD*) $50,77 \pm 10,65\%$ Butandiol erreicht. Allerdings ist die Kohlenstoffbilanz in diesen Fällen nicht ausgeglichen, da zusätzlich noch Acetat nachgewiesen werden konnte. Dies könnte daran liegen, da es bei einer OD von 1 zu einer sehr schnellen Verstoffwechslung von Laktat kommt. Der Zeitraum zwischen Inokulation und Probennahme wurde möglichst kurzgehalten, kann aber dennoch für den Abbau des Substrates verantwortlich sein. Da im Medium 10 mM Laktat eingewogen waren, aber nur 5-7 mM in der Probe zum Zeitpunkt 0 nachgewiesen werden können. Für die Berechnung diente die Laktatbannahme und Produktzunahme in 4 Stunden. Weiterhin könnte ein Teil der Casaminosäuren genutzt worden sein um Produkte zu bilden.

Durch die Deletion der Acetatsynthese-Gene waren nach vier Stunden die einzig detektierbaren Produkte im Zellsuspensionsassay Acetoin oder Butandiol. Hierbei wurden die besten Ausbeuten durch den Stamm JG 1039 ($\Delta\lambda\Delta\textit{ackA/pta}$ mit pBAD-*alsSD*) mit $100,93 \pm 37,8\%$ erreicht. Mit Stamm JG 1113 ($\Delta\lambda\Delta\textit{ackA/pta}$ mit pBAD-*budC-alsSD*) wurden $40,79 \pm 6,36\%$ Butandiolausbeute erreicht. Die $\Delta\textit{ackA/pta}$ -Stämme zeigen Wachstumsdefizite, welche ein längeres Inkubieren im Vorfeld erforderten und keine anaeroben Vorkulturen zuließen. Darüber hinaus erhielt man reinere Produkte.

Die Stämme mit den Plasmiden zeigen im Vergleich zu den jeweilig korrespondierenden Stämmen mit den genomisch integrierten Genen eine höhere Ausbeute (Tabelle 43).

Tabelle 43: Stammvergleich aus den Zellsuspensionsassays und BEC-Experimenten zwischen den korrespondierenden Stämmen mit Plasmid und genomischer Integration

Stammvergleich	Ausbeutenvergleich Zellsuspensionsassay (A=Acetoin, B=Butandiol) Alle Stämme vorinduziert	Ausbeutenvergleich BEC-Experimente (A=Acetoin, B=Butandiol)
$\Delta\lambda$ mit pBAD- <i>alsSD</i> → $\Delta\lambda::alsSD$	107% A → 48% A	63% A* → 23,5% A*
$\Delta\lambda\Delta ackA/pta$ mit pBAD- <i>alsSD</i> → $\Delta\lambda\Delta ackA/pta::alsSD$	101% A → 68% A	78% A → 32% A ^{*/***}
$\Delta\lambda\Delta ackA/pta$ mit pBAD- <i>budC-alsSD</i> → $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta::budC$	8% A und 41% B → 21% A und 26% B	19% A und 54% B → 45% B ^{*/**}

* Anmerkung: Vorinduziert, in späteren Experimenten wurde, um die Ausbeute zu erhöhen, die Vorkultur vorinduziert.

** Anmerkung: Potentialswitch-Experiment kann nicht in direkten Vergleich genommen werden, da Experimentbedingungen unterschiedlich waren.

*** Anmerkung: Laufzeit war nicht identisch

Hierbei lässt sich erkennen, dass in den BEC-Experimenten von den Stämmen mit genomisch integrierten Genen etwa ein Drittel der Ausbeuten erreicht werden im Vergleich zu den Experimenten mit den Plasmid-tragenden Stämmen. Ein besonderes Augenmerk ist hierbei auf das Experiment mit den Butandiol-produzierenden Stämmen zu legen. Während der Stamm mit Plasmid eine Mischung von Acetoin und Butandiol und kein Acetat aufweist, zeigt der Stamm mit den genomisch integrierten Genen kein Acetoin, aber eine Acetatproduktion nach Aufbrauchen des Substrates im Potentialswitch-Experiment. Obwohl die Ausbeuten mit Plasmid-tragenden Stämmen höher sind ist dennoch die Anwendung der Antibiotika-sensitiven Stämme den resistenten in der Anwendung vorzuziehen.

Die Deletion der Gene für die Acetatkinase und Phosphotransacetylase ist in Bezug auf die Produktreinheit förderlich. Da die Anwendung dieser Stämme in

bioelektrochemischen Systemen (BES) mit elektrogelagertem Material zunächst aber ein Problem darstellen, müssen die Experiment-Parameter angepasst werden. Gründe für die geringe Stromproduktion mit elektrogelagertem Material könnten die geringere Fitness und damit verbundene Produktion von Cytochromen oder Flavinen sein. Da kein anaerobes Wachstum mehr möglich ist, teilen sich die Zellen nicht und gehen zugrunde. Dies ist auch in der Regel mit einer Abnahme der OD₆₀₀ von Start bis Ende eines BEC-Laufes zu erkennen. Da Flavine sowohl in der Wachstums- als auch der stationären Phase gebildet werden, nimmt dies vermutlich geringen Einfluss auf die Stromproduktion mit elektrogelagertem Material. Um das Problem der fehlenden Anheftung auf der Anode zu lösen, wurde eine Co-Kultivierung mit *G. sulfurreducens* angesetzt.

G. sulfurreducens bildet ein leitfähiges Biofilm-Netzwerk (Bond *et al.*, 2012). Dieses geschieht sowohl über Typ-IV-Pili als auch äußere Membran-Cytochrome. Bond *et al.* (2012) beschreiben den Elektronentransport im Biofilm folgendermaßen. Bei der Oxidation von Acetat zu CO₂ entstehen Protonen und Elektronen (Bond *et al.*, 2012). Die Protonen werden in das Medium abgegeben und die Elektronen, im Falle der ersten Zellschicht auf der Anode, werden direkt auf die Anode übertragen. Jede weitere Zellschicht überträgt die Elektronen auf äußere Membrancytochrome oder Pili der Zellen, die näher an der Anode lokalisiert sind. Zusätzlich visualisieren sie in einer Abbildung den Gradienten des Gesamtoxidationslevels der Cytochrome und den pH-Wert innerhalb des Biofilms auf der Anode. So beschreiben die Autoren einen höheren Anteil an reduzierten Cytochromen und einen höheren pH-Wert von der Anode entfernt im Vergleich zur Zellschicht direkt auf der Anode (Bond *et al.*, 2012). Zusätzlich beschreiben die Autoren die Möglichkeit, dass der Biofilm auf der Anode in der Dicke wächst, bis der pH-Wert in der Nähe der Anodenoberfläche so weit absinkt, dass die Elektronenübertragung der anodennahen Zellen gehemmt wird. Dieses Phänomen kann somit die Zellen im Biofilm einschränken Elektronen auf die Anode zu übertragen. Als weiteren Grund beschreiben sie die zu geringwerdende lokale Konzentration der von den äußersten Zellen oxidierten Cytochrome, um weiteres Wachstum zu unterstützen (Bond *et al.*, 2012). Bei einer Co-Kultivierung mit *S. oneidensis* war die Vorstellung, dass sich *S. oneidensis* in den leitfähigen Biofilm einbetten und Elektronen an die leitfähigen Strukturen abgeben könnte. *S. oneidensis* zeigt weniger Zellen auf der Anode im Vergleich zu *G. sulfurreducens*, dieses wurde zum Beispiel von Dolch *et al.* (2014) gezeigt (Dolch *et al.*, 2014). In dieser Studie wurden die jeweiligen

Monokulturen im Vergleich zur Co-Kultivierung gezeigt. Die Inokulation der bioelektrochemischen Systeme erfolgte in einem Verhältnis von 1:1 und anschließend wurden die Anoden für die Zellzählung isoliert. Es wurden in Co-Kultivierung 9% *S. oneidensis*-Zellen und 91% *G. sulfurreducens*-Zellen auf der Anode via qPCR nachgewiesen (Dolch *et al.*, 2014). Damit ist das Verhältnis der auf der Anode nachgewiesenen *S. oneidensis*-Zellen um ein 11faches und *G. sulfurreducens*-Zellen um ein 1,7faches höher im Vergleich zur jeweiligen Monokultur (Dolch *et al.*, 2014). Die Autoren folgern daraus, dass *G. sulfurreducens* die Anheftung von *S. oneidensis* auf der Anode erhöht, welches aus einem synergistischen Effekt der Acetatproduktion durch *S. oneidensis* und umgehender Acetatkonsumierung durch *G. sulfurreducens* hervorgehen könnte (Dolch *et al.*, 2014).

Für die Co-Kultivierung wurde zum einen der Stamm $\Delta\lambda::alsSD$ (JG 919) und $\Delta\lambda::alsSD\Delta ackA/pta$ (JG 1040) eingesetzt. Bei der Co-Kultivierung mit JG 919 wurde kein detektierbares Acetoin gebildet. Ein Grund könnte der Flux Richtung Acetat sein, da dieses als Substrat für *G. sulfurreducens* dient. Um dies zu vermeiden und *S. oneidensis* trotzdem die Anheftung auf der Anode bzw. die Abgabe der Elektronen auf die Anode zu erleichtern, wurde in einem weiteren Ansatz die Mutante ohne Acetatkinase und Phosphotransacetylase gewählt. Auch in diesem Aufbau konnte kein Acetoin detektiert werden. Dies könnte zum einen am geänderten Medium liegen, da hier kein wie bisher verwendetes PBS-Medium, sondern Co-Kulturmedium verwendet werden muss. Als Weiteres ist die Möglichkeit des pH-Shifts in Betracht zu ziehen. In Versuchen ohne *G. sulfurreducens* und ohne die Produktion von Acetat wurde ein pH-Wert Anstieg von 7,4 auf etwa 8,0 beobachtet. Während Acetat den pH-Wert senkt, steigt der pH-Wert bei ausschließlicher Acetoinproduktion merklich. Die Co-Kultur-Versuche wiesen einen konstanten pH-Wert von 7 auf, da diese zusätzlich mit N_2/CO_2 begast wurden. Obwohl in Xiao *et al.* (2014) mehrere Quellen genannt werden, die den pH-Wert als Prozessparameter im sauren Milieu hielten, bzw. nicht einstellten, merken die Autoren an, dass das pH-Optimum für Acetoin- und Butandiolproduktion auf den jeweiligen Mikroorganismus und das jeweilige Substrat angepasst werden muss (Xiao and Lu, 2014). Weiterhin ist anzumerken, dass folglich mit einer höheren Produktion von Acetoin (und damit weniger Acetat) der pH-Wert im Medium ansteigt.

Nachdem die Co-Kultivierung zunächst ohne merkliche Acetoinproduktion durchgeführt wurde, wurde als weitere Konsequenz versucht die Fitness des Stammes

zu verbessern. Da bei einem Potential von 0 mV gegen NHE der Organismus im anaeroben-Stoffwechsel nur einen unvollständigen Citratzyklus durchläuft, kann dieser nicht zur Energiegewinnung genutzt werden. Hierbei wird vom *S. oneidensis*-Wildtyp unter anoxischen Bedingungen Substratstufen-Phosphorylierung über die Produktion von Acetat zur Energiegewinnung genutzt dies ist bei der *ackA/pta*-Mutante nicht mehr möglich (Hunt *et al.*, 2010).

Hirose *et al.* (2018) zeigten, dass unter Anlegen eines hohen Potentials von +500 mV gegen Standard Wasserstoff Elektrode (SHE), höhere Stromdichten messbar sind. Zusätzlich zeigten sie nach einer Transkriptomanalyse, dass die Gene für NADH-Oxidation und ATP-Synthese hochreguliert sind. Weiterhin wurden die Gene für die NADH-Regeneration, wie für die Pyruvat-Dehydrogenase (*aceF*) und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (*sucAB*), ebenfalls unter den getesteten Bedingungen hochreguliert (Hirose *et al.*, 2018). So vermuten die Autoren das NADH-abhängige katabolische Prozesse unter Anlegen eines hohen Potentials an die Anode aktiv sind (Hirose *et al.*, 2018). Diese Überlegung führte zum Anlegen eines hohen Potentials in den Versuchen mit der Acetat-defizienten Mutante, um die Fitness des Stammes zu erhöhen. Hierbei sollte dem Stamm bei +500 mV gegen NHE die Möglichkeit gegeben werden, über den Citratzyklus Energie zu generieren. Die Experimente wurden zum einen mit Potentialswitch durchgeführt und zum anderen im Vergleichsexperiment mit konstanten Potentialen.

Nachdem ein kontinuierlicher Switch zwischen 500 mV gegen NHE (HP (engl.: *High Potential*)) und 0 mV gegen NHE (LP (engl.: *Low Potential*)) alle vier Stunden zu keiner hohen Acetoinproduktion führte, wurde ein Experiment mit vier Stunden HP und 20 Stunden LP durchgeführt. Hierbei stieg die Acetoinproduktion auf 2,11 mM aus 8,42 mM Laktat an. Der Stamm wurde zusätzlich ohne Switch für eine Woche bei HP und LP getestet. Hierbei entstand im Lauf bei hohem Potential etwa 2 mM Acetoin und bei niederem Potential 1,3 mM Acetoin. Nach Verbrauch des Substrates konnte Acetat im Medium detektiert werden. Dieses Phänomen wurde ebenfalls in den Zellsuspensionsassays beobachtet. Nachdem das Substrat aufgebraucht ist, sinkt in der Regel die OD, welches mit Zellyse einhergeht und hierbei scheint indirekt Acetat zu entstehen. Zudem wurden die Laktatumsatzraten betrachtet. In diesem Zusammenhang scheint die Umsatzrate im hohen Potential schneller anzusteigen, wie auch die Acetoinproduktion und bei diesem Level zu bleiben, bis das Substrat aufgebraucht ist. Damit scheint das Substrat bei hohem Potential schneller zu Acetoin

Nutzung des Citratzyklus. Während bei der Oxidation von Laktat zu Acetat vier Elektronen auf die Anode übertragen werden, im Fall von Acetoin zwei, werden durch den Citratzyklus 12 Elektronen frei. Hirose *et al.* (2018) merken zusätzlich an, dass unter Bedingungen bei hohem Potential *S. oneidensis* anteilig einen NADH-abhängigen Stoffwechsel bestehend aus Pyruvatdehydrogenase (Pdh) und NADH-Dehydrogenase (Ndh) für die Umsetzung von Pyruvat nutzt. Weiterhin wird beschrieben, dass aufgrund der Aktivierung der NADH-Dehydrogenase (Nuo) die Menge an protonenmotorischer Kraft (engl.: Proton Motiv Force (PMF)) je Elektron erhöht wird (Hirose *et al.*, 2018).

Da die beste Acetoinausbeute bei einem Wechsel des Potentials über 4 Stunden bei hohem und 20 Stunden bei niederem Potentials zu sein scheint, wurde dieses Experiment auch in Co-Kultur mit *G. sulfurreducens* durchgeführt. Hintergrund der Co-Kultivierung war das Einbetten der *S. oneidensis* Zellen in einen leitfähigen *G. sulfurreducens*-Biofilm um eine höhere Produktivität in Bezug auf Strom und Acetoin zu erzielen. In diesen Experimenten konnten jedoch nur geringe Mengen an Acetoin detektiert werden mit einer Ausbeute von etwa 4%. Dies lässt auf eine andere Limitierung in diesem Experiment vermuten. Es ist auch möglich, dass die Medienkomposition und der pH-Wert eventuell einen entscheidenderen Anteil an der Acetoinproduktion haben, als bisher angenommen.

In Vorversuchen wurde getestet, ob *G. sulfurreducens* in der Lage ist Acetoin zu verstoffwechseln, dafür gab es aber keinen Hinweis. Obwohl *G. sulfurreducens* die Gene für einen D-/L-Laktattransporter und eine Laktatdehydrogenase besitzt, ist Wachstum auf Laktat als primäre Kohlenstoffquelle mit Fe(III) als Akzeptor zunächst ausgeschlossen worden (Caccavo *et al.*, 1994). Nach Adaption an Laktat über mehrere Generationen (etwa 151 Generation und 23 Überführungen), wurde die Verdopplungszeit auf 8,3h und die initiale Lag-Phase minimiert (Summers *et al.*, 2012). Für Acetat ist die Verdopplungszeit auf 5h beschrieben. Des Weiteren beschreiben die Autoren, dass in den adaptierten Stämmen die Gene *sucCD* bei Wachstum in Medium mit Laktat als Elektronendonator höher exprimiert werden, welches wohl zu einer vollständigen Oxidation von Laktat über den Citratzyklus führt (Summers *et al.*, 2012).

Zum anderen könnte der Potentialshift zu einer Veränderung des Verhaltens von *G. sulfurreducens* führen. Bosch *et al.* (2014) testeten verschiedene Anodenpotentiale mit *G. sulfurreducens* und untersuchten die Biomasse und Stromproduktion (Bosch *et*

al., 2014). Die Autoren beschreiben Experimente von -105 bis +645 mV gegen SHE in denen *G. sulfurreducens* identische Mengen an Biomasse je gemessenem Elektron bildet. Die Autoren gehen davon aus, dass der Organismus nicht in der Lage ist höhere verfügbare Energien in ATP zur Energiekonservierung umzuwandeln. Sie sehen hierfür zum einen die Möglichkeit das *G. sulfurreducens* das hohe Potential aufgrund physiologischer Einschränkungen nicht ausschöpfen kann und zum anderen dass es die Stoffwechseleffizienz senkt und so weniger Biomasse je Energieeinheit gebildet wird (Bosch *et al.*, 2014). In diesem Fall postulieren sie einen Verlust an Energie in Wärme (Bosch *et al.*, 2014). Somit könnte das Anlegen des Potentialwechsels keine größere Stresssituation für *G. sulfurreducens* bedeuten.

Es bleiben demnach für die Steigerung der Acetoinausbeute in bioelektrochemischen Systemen mit der Co-Kultivierung weitere Versuche offen.

5.3 Ausblick

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Produktion von Butandiol und Acetoin durch *S. oneidensis* in bioelektrochemischen Systemen möglich ist. Die Produktion konnte durch weitere Anpassungen, wie Potentialwechsel mit den Antibiotika-sensitiven Stämmen gesteigert werden. Eine weitere Steigerung der Produktivität kann über die Anwendung elektrogesponnener Materialien versucht werden, da diese bereits eine Erhöhung der Stromproduktion in Nicht-Produktionsstämmen zeigten. Des Weiteren könnten mehrere Kopien der Produktionsgene in das Genom integriert werden. Da die Versuche mit Plasmiden in der Regel höhere Ausbeuten im direkten Vergleich zeigten, ist dies vermutlich auf die erhöhte Genkopienzahl im Organismus zurückzuführen. Weiterhin ist es von Vorteil die Stämme in der Vorkultur bereits zu induzieren, damit die notwendigen Enzyme Acetolaktat-Synthase, Acetolaktat-Decarboxylase und Butandioldehydrogenase bereits von Beginn an Laktat umsetzen können und keine Energie in die Proteinsynthese verschwendet werden muss.

Die Substraterweiterung mit *S. oneidensis* in Monokultur zeigte bis auf Glucose keine Erfolge, aber auch hier lässt sich durch die weitere Integration von weiteren Genen die Wahrscheinlichkeit steigern.

Das Verstoffwechseln von Glycerin zeigte bisher keinen Erfolg. Hierbei kann es von Nutzen sein ein weiteres Gen zu integrieren, welches für eine Triose-Isomerase kodiert. Dies kann eine Umsetzung von Dihydroxyacetonphosphat beschleunigen.

Dabei würde die Funktionalität der Gene für die Methylglyoxalatsynthese und Glyoxalase III nicht mehr zwingend notwendig sein und als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Weiterhin könnte eine Glycerinkinase aus *E. coli* eingefügt werden, falls der erste Schritt im Glycerinabbauweg bereits die Limitierung darstellt.

Um *S. oneidensis* zum Cellulose-Abbau zu befähigen sollte die Integration des Cellobiose-Transporters von *L. lactis* zusammen mit der Cellobiase durchgeführt werden. Es handelt sich hierbei um ein Operon aus vier Genen für den Transporter *ptcCAB* und der Cellobiase (β -1,4-Glucosidase) *celA*. Eine weitere Möglichkeit bietet das Koppeln der Cellobiase an das lösliche Membrancytochrom *MtrF_{löslich}* wie es bereits für die Cellulase (*Cel_{strep}*) angewendet wurde. Dies würde den extrazellulären Abbau von Cellulose zu Glucose ermöglichen, welches der Glucose-adaptierte Stamm (*GLU_{adapt}*) wiederum als Substrat nutzen kann. Im Weiteren kann dies dann auf die Acetoin- bzw. Butandiolproduzenten mit den genomisch integrierten Genen angewendet werden.

Mit Zusammenführen dieser Wege wäre *S. oneidensis* in der Lage in bioelektrochemischen Systemen einen billigen Rohstoff wie Cellulose zu einer Plattformchemikalie wie Acetoin bzw. Butandiol umzusetzen.

6 Literatur

- Ahmad, F., Atiyeh, M.N., Pereira, B., and Stephanopoulos, G.N. (2013) A review of cellulosic microbial fuel cells: Performance and challenges. *Biomass and Bioenergy* **56**: 177–188.
- Beblawy, S., Bursac, T., and Gescher, J. (2018a) Elektrofermentation von Acetoin. *BIOspektrum* **24**: 100–103.
- Beblawy, S., Bursac, T., Paquete, C., Louro, R., Clarke, T.A., and Gescher, J. (2018b) Extracellular reduction of solid electron acceptors by *Shewanella oneidensis*. *Mol Microbiol* **109**: 571–583.
- Beliaev, A.S., Thompson, D.K., Khare, T., Lim, H., Brandt, C.C., Li, G., *et al.* (2002) Gene and Protein Expression Profiles of *Shewanella oneidensis* during Anaerobic Growth with Different Electron Acceptors. *Omi A J Integr Biol* **6**: 39–60.
- Biswas, R., Yamaoka, M., Nakayama, H., Kondo, T., Yoshida, K.I., Bisaria, V.S., and Kondo, A. (2012) Enhanced production of 2,3-butanediol by engineered *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**: 651–658.
- Bond, D.R., Strycharz-Glaven, S.M., Tender, L.M., and Torres, C.I. (2012) On electron transport through *geobacter* biofilms. *ChemSusChem* **5**: 1099–1105.
- Bosch, J., Lee, K.Y., Hong, S.F., Harnisch, F., Schröder, U., and Meckenstock, R.U. (2014) Metabolic efficiency of *Geobacter sulfurreducens* growing on anodes with different redox potentials. *Curr Microbiol* **68**: 763–768.
- Brutinel, E.D., and Gralnick, J.A. (2012) Anomalies of the anaerobic tricarboxylic acid cycle in *Shewanella oneidensis* revealed by Tn-seq. *Mol Microbiol* **86**: 273–283.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (2010) Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030 - Unser Weg zu einer bio-basierten Wirtschaft-Biobasierte Industrie, Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). 48.
- Bursac, T. (2015) Mikroben-Elektroden-Interaktion als Werkzeug in der mikrobiellen Biotechnologie. .
- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., McInerney, M.J., and McInerney, M.J. (1994) *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-

oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3752–9.

Canstein, H. Von, Ogawa, J., Shimizu, S., and Lloyd, J.R. (2008) Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Appl Environ Microbiol* **74**: 615–623.

Castro, R., Neves, A.R., Fonseca, L.L., Pool, W.A., Kok, J., Kuipers, O.P., and Santos, H. (2009) Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease. *Mol Microbiol* **71**: 795–806.

Celińska, E., and Grajek, W. (2009) Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnol Adv* **27**: 715–725.

Chen, T., Liu, W.X., Fu, J., Zhang, B., and Tang, Y.J. (2013) Engineering *Bacillus subtilis* for acetoin production from glucose and xylose mixtures. *J Biotechnol* **168**: 499–505.

Cherubini, F., Jungmeier, G., Germany, T.W., and Ireland, P.W. (2009) IEA Bioenergy Task 42 – Countries Report. 1–37.

Chubiz, L.M., and Marx, C.J. (2017) Growth trade-offs accompany the emergence of glycolytic metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* **199**.

Dietrich, H. (2015) Grundlagen und Anwendung des Transports äußerer Membrancytochrome. .

Ding, B., Wang, M., Wang, X., Yu, J., and Sun, G. (2010) Electrospun nanomaterials for ultrasensitive sensors. *Mater Today* **13**: 16–27.

Dolch, K., Danzer, J., Kabbeck, T., Bierer, B., Erben, J., Förster, A.H., *et al.* (2014) Characterization of microbial current production as a function of microbe-electrode-interaction. *Bioresour Technol* **157**: 284–292.

Dong, Z., Kennedy, S.J., and Wu, Y. (2011) Electrospinning materials for energy-related applications and devices. *J Power Sources* **196**: 4886–4904.

Edel, M. (2018) Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten der Elektrodeninteraktion von *Shewanella oneidensis*. .

Flynn, C.M., Hunt, K.A., Gralnick, J.A., and Sreenc, F. (2012) Construction and

elementary mode analysis of a metabolic model for *Shewanella oneidensis* MR-1. *BioSystems* **107**: 120–128.

Flynn, J.M., Ross, D.E., and Hunt, K.A. (2010) Enabling Unbalanced Fermentations by Using Engineered Electrode-Interfaced Bacteria. **1**: 1–8.

Fonseca, B.M., Paquete, C.M., Neto, S.E., Pacheco, I., Soares, C.M., and Louro, R.O. (2013) Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biochem J* **449**: 101–108.

Förster, A.H., Beblawy, S., Golitsch, F., and Gescher, J. (2017) Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Biofuels* **10**: 65.

Förster, A.H., and Gescher, J. (2014) Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Front Bioeng Biotechnol* **2**: 16.

Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., and Stroud, R.M. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**: 481–6.

Fuchs, G., Schlegel, H.G., and Eitinger, T. (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, .

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**: 343–345.

Glick, B.R. (1995) Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv* **13**: 247–261.

Gödeke, J., Paul, K., Lassak, J., and Thormann, K.M. (2011) Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ISME J* **5**: 613–626.

Goh, E.-B., Bledsoe, P.J., Chen, L.-L., Gyaneshwar, P., Stewart, V., and Igo, M.M. (2005) Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system. *J Bacteriol* **187**: 4890–9.

Gralnick, J.A., Vali, H., Lies, D.P., and Newman, D.K. (2006) Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 4669–4674.

- Hartshorne, R.S., Reardon, C.L., Ross, D., Nuester, J., Clarke, T.A., Gates, A.J., *et al.* (2009) Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 22169–22174.
- Hirose, A., Kasai, T., Aoki, M., Umemura, T., Watanabe, K., and Kouzuma, A. (2018) Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nat Commun* **9**: 1083.
- Hunt, K.A., Flynn, J.M., Naranjo, B., Shikhare, I.D., and Gralnick, J.A. (2010) Substrate-level phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *J Bacteriol* **192**: 3345–3351.
- Jarvis, M. (2003) Chemistry: Cellulose stacks up. *Nature* **426**: 611–612.
- Kim, C. (2005) Electrochemical characterization of electrospun activated carbon nanofibres as an electrode in supercapacitors. *J Power Sources* **142**: 382–388.
- Kipf, E., Koch, J., Geiger, B., Erben, J., Richter, K., Gescher, J., *et al.* (2013) Systematic screening of carbon-based anode materials for microbial fuel cells with *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresour Technol* **146**: 386–392.
- Kotloski, N.J., and Gralnick, J.A. (2013) Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio* **4**: 10–13.
- Lee, S., Kim, B., Park, K., Um, Y., and Lee, J. (2012) Synthesis of pure meso-2,3-butanediol from crude glycerol using an engineered metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* **166**: 1801–1813.
- Liu, H., and Logan, B.E. (2004) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ Sci Technol* **38**: 4040–4046.
- Lovley, D.R. (1991) Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) Reduction. **55**: 259–287.
- Lutz, R., and Bujard, H. (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **25**: 1203–1210.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. van, and Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 506–77, table

of contents.

Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2008) *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 3968–3973.

Méthé, B.A., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Paulsen, I.T., Nelson, W., Heidelberg, J.F., et al. (2003) Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal Reduction in Subsurface Environments. *Science (80-)* **302**: 1967–1969.

Meyer, T.E., Tsapin, A.I., Vandenberghe, I., Smet, L. De, Frishman, D., Neelson, K.H., et al. (2004) Identification of 42 Possible Cytochrome C Genes in the *Shewanella oneidensis* Genome and Characterization of Six Soluble Cytochromes. *Omi A J Integr Biol* **8**: 57–77.

Misra, K., Banerjee, a B., Ray, S., and Ray, M. (1995) Glyoxalase III from *Escherichia coli*: a single novel enzyme for the conversion of methylglyoxal into D-lactate without reduced glutathione. *Biochem J* **305 (Pt 3)**: 999–1003.

Myers, C.R., and Myers, J.M. (1997) Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* **179**: 1143–1152.

Nakagawa, G., Kouzuma, A., Hirose, A., Kasai, T., Yoshida, G., and Watanabe, K. (2015) Metabolic characteristics of a glucose-utilizing *Shewanella oneidensis* strain grown under electrode-respiring conditions. *PLoS One* **10**: 1–14.

Peschke, T. (2014) Nicht-stöchiometrische-Fermentation in *Escherichia coli*. .

Rabaey, K., and Verstraete, W. (2005) Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol* **23**: 291–298.

Rabie, E., Serem, J.C., Oberholzer, H.M., Gaspar, A.R.M., and Bester, M.J. (2016) How methylglyoxal kills bacteria: An ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol* **40**: 107–111.

Reguera, G., Nevin, K.P., Nicoll, J.S., Covalla, S.F., Woodard, T.L., and Lovley, D.R. (2006) Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7345–7348.

Ren, Z., Ward, T.E., and Regan, J.M. (2007) Electricity production from cellulose in a

microbial fuel cell using a defined binary culture. *Environ Sci Technol* **41**: 4781–4786.

Richter, K., Schicklberger, M., and Gescher, J. (2012) Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol* **78**: 913–921.

Rodionov, D.A., Yang, C., Li, X., Rodionova, I.A., Wang, Y., Obraztsova, A.Y., *et al.* (2010) Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. *BMC Genomics* **11**: 494.

Rosenbaum, M.A., Bar, H.Y., Beg, Q.K., Segrè, D., Booth, J., Cotta, M.A., and Angenent, L.T. (2011) *Shewanella oneidensis* in a lactate-fed pure-culture and a glucose-fed co-culture with *Lactococcus lactis* with an electrode as electron acceptor. *Bioresour Technol* **102**: 2623–2628.

Ross, D.E., Ruebush, S.S., Brantley, S.L., Hartshorne, R.S., Clarke, T.A., Richardson, D.J., and Tien, M. (2007) Characterization of Protein-Protein Interactions Involved in Iron Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5797–5808.

Santos, T.C., Silva, M.A., Morgado, L., Dantas, J.M., and Salgueiro, C.A. (2015) Diving into the redox properties of *Geobacter sulfurreducens* cytochromes: a model for extracellular electron transfer. .

Serres, M.H., and Riley, M. (2006) Genomic analysis of carbon source metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: Predictions versus experiments. *J Bacteriol* **188**: 4601–4609.

SGL CARBON GmbH SIGRACELL battery felts - Virgin and thermal activated electrodes made from carbon and graphite felt. .

Shanks, R.M.Q., Kadouri, D.E., MacEachran, D.P., and O'Toole, G.A. (2009) New yeast recombineering tools for bacteria. *Plasmid* **62**: 88–97.

Shi, L., Squier, T.C., Zachara, J.M., and Fredrickson, J.K. (2007) Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: A key role for multiheme c-type cytochromes. *Mol Microbiol* **65**: 12–20.

Sigma Free Glycerol Reagent - Technical Bulletin. 8–10.

Silva, G.P. da, Mack, M., and Contiero, J. (2009) Glycerol: A promising and abundant

carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* **27**: 30–39.

Sturm, G., Richter, K., Doetsch, A., Heide, H., Louro, R.O., and Gescher, J. (2015) A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime. *ISME J* **9**: 1802–1811.

Subedi, K.P., Choi, D., Kim, I., Min, B., and Park, C. (2011) Hsp31 of *Escherichia coli* K-12 is glyoxalase III. *Mol Microbiol* **81**: 926–936.

Summers, Z.M., Ueki, T., Ismail, W., Haveman, S.A., and Lovley, D.R. (2012) Laboratory evolution of *Geobacter sulfurreducens* for enhanced growth on lactate via a single-base-pair substitution in a transcriptional regulator. *ISME J* **6**: 975–983.

Tang, Y.J., Meadows, A.L., Kirby, J., and Keasling, J.D. (2007) Anaerobic central metabolic pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 reinterpreted in the light of isotopic metabolite labeling. *J Bacteriol* **189**: 894–901.

Tran, Q.H., and Uden, G. (1998) Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *Eur J Biochem* **251**: 538–543.

Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J., *et al.* (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 705–724.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., and Ivanova, E.P. (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **14**: 2535–2554.

Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H., and Prior, B.A. (2001) Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnol Adv* **19**: 201–223.

Werpy T., P.G. (2004) Top value added chemicals from biomass: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. **1**.

Wu, G., Yan, Q., Jones, J.A., Tang, Y.J., Fong, S.S., and Koffas, M.A.G. (2016) Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. *Trends Biotechnol* **34**: 652–664.

Xiao, Z., and Lu, J.R. (2014) Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnol Adv* **32**: 492–503.

Xiao, Z., and Xu, P. (2007) Acetoin metabolism in bacteria. *Crit Rev Microbiol* **33**: 127–

140.

Zussman, E., Chen, X., Ding, W., Calabri, L., Dikin, D.A., Quintana, J.P., and Ruoff, R.S. (2005) Mechanical and structural characterization of electrospun PAN-derived carbon nanofibers. *Carbon N Y* **43**: 2175–2185.

7 Anhang

7.1 Darstellung des beruflichen und wissenschaftlichen Werdegangs

Ausbildung

- Seit Juli 2015 Promotion am Institut für Angewandte Biologie, *KIT - Karlsruher Institut für Technologie*.
- Okt. 2013 – Mai 2015 **Studium der allgemeinen Biologie (Master)**, *KIT - Karlsruher Institut für Technologie*.
Abschluss als Master of Science mit einer Gesamtnote von 1,1 mit Auszeichnung und unter Regelstudienzeit
Thema der Masterarbeit: „Mikroben-Elektroden-Interaktion als Werkzeug in der mikrobiellen Biotechnologie“
- Okt. 2010 – Sept. 2013 **Studium der allgemeinen Biologie (Bachelor)**, *KIT - Karlsruher Institut für Technologie*.
Abschluss als Bachelor of Science mit einer Gesamtnote von 1,2 mit Auszeichnung
Thema der Bachelorarbeit: „Verstärkte Biofilmbildung und synthetische endogene Elektronenshuttle als potentielle Werkzeuge der Hocheffizienzbrennstoffzelle“
- 2007 – 2010 **Gesundheits- und Krankenpflegerin**, *Krankenpflegeschule der St. Vincentius-Kliniken*, Karlsruhe.
Abschluss als jahrgangsbeste Schülerin mit 1,3
- 1997 - 2006 **Gymnasium in der Taus**, *Backnang*.
Allgemeine Hochschulreife mit 2,0

Berufserfahrung

- Seit Juli 2015 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**, *Institut für Angewandte Biowissenschaften*, *KIT - Karlsruher Institut für Technologie*.
- Okt. 2012 – Aug. 2014 **Hilfswissenschaftliche Tätigkeit**, *Institut für Angewandte Biowissenschaften*, *KIT - Karlsruher Institut für Technologie*.
Betreuung von Studentengruppen im Praktikum, sowie Mitarbeit im Labor und an aktuellen Forschungsthemen
- Mai - Juli 2012 **Hilfswissenschaftliche Tätigkeit**, *Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie*, *KIT - Karlsruher Institut für Technologie*.
Betreuung von Studentengruppen im tierphysiologischen Praktikum
- Nov. 2011 **Hilfswissenschaftliche Tätigkeit**, *Botanisches Institut I*, *KIT - Karlsruher Institut für Technologie*.
Unterrichten von Studentengruppen zur Einführung in das Studium

Stipendien und Auszeichnungen

- Juni 2014 – Mai 2015 **Stipendium**, *Studienstiftung des deutschen Volkes*,
Förderung von Studenten aufgrund der Kriterien fachlicher Kompetenz, Weite des Horizonts und sozialer Verantwortung
- Okt. 2012 – Mai 2014 **Stipendium**, *Deutschlandstipendium 2012 und 2013*,
Leistungsbedingte Förderung von Studenten - BASF
- Mai – Okt.2012 **Auszeichnung mit dem Research Student Award**,
Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie, *KIT - Karlsruher Institut für Technologie*.

Karlsruhe, den 25. April 2019

Thea Bursac